



Substrateigenschaften antiviral aktiver Nucleotidanaloga gegenüber Polymerasen

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

von

Thiago Dinis de Oliveira

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Universität Hamburg

Hamburg 2017

1. Gutachter:

Prof. Dr. C. Meier

2. Gutachter:

Prof. Dr. Dr. h. c. mult. W. Franke

Datum der Disputation: 16.03.2018

Die Druckfreigabe für diese Arbeit wurde am 16.03.2018 durch das Studienbüro des Fachbereiches Chemie der Universität Hamburg erteilt.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Chris Meier in der Zeit von Oktober 2012 bis Dezember 2017 angefertigt.

I Publikationsliste

Gollnest T., Dinis de Oliveira T., Rath A., Schols D., Balzarini J., Meier C.; Membrane-permeable triphosphate prodrugs of nucleoside analogues. **Angewandte Chemie**, DOI: 10.1002/ange.201511808

Gollnest T., Dinis de Oliveira T., Schols D., Balzarini J., Meier C.; Lipophilic prodrugs of nucleoside triphosphates as biochemical probes and potential antivirals. **Nature Communications**, DOI 10.1038/ncomms9716

II Inhaltsverzeichnis

A Abkürzungsverzeichnis	iv
1. Zusammenfassung	1
2. Summary	5
3. Einleitung	9
4. Kenntnisstand.....	12
4.1 Biologisch aktive Nucleosidanaloga	12
4.2 Carbocyclische Nucleosidanaloga.....	13
4.3 Bioaktive carbocyclische Nucleosidanaloga	14
4.4 Synthesestrategien zur Darstellung carbocyclischer Nucleosidanaloga	18
4.5 Bioaktivierung von Nucleosiden und Nucleosidanaloga	19
4.6 Das Prodrug-Konzept.....	21
4.7 DNA-Polymerasen	24
5. Aufgabenstellung.....	28
6. Resultate und Diskussion	31
6.1 Darstellung und molekularbiologische Untersuchungen des carbocyclischen Nucleosids <i>D-carba</i> -dT 16	31
6.1.1 Erste literaturbekannte Beiträge zur Aufklärung der Funktionsweise des Wirkmechanismus ausgehend von <i>D-carba</i> -dT 16	31
6.1.2 Syntheseroute zur Darstellung der Zielverbindungen <i>D-carba</i> -dT 16 , <i>D-carba</i> -dTTP 24 und des entsprechenden Phosphoramidits 25	35
6.1.3 Molekularbiologische Untersuchungen	51
6.2 Entwicklung neuartiger Nucleosidtriphosphat-Prodrugs	85
6.2.1 Die Bestätigung des BAB-TriPPPro-Konzeptes	88
6.2.2 Evaluierung eines Konzeptes basierend auf γ -modifizierten-Triphosphat-Nucleosiden	90
6.3 Beiträge zur Etablierung eines Synthesezugangs zu carbocyclischen 2'-Fluor-modifizierten-L-Nucleosiden	105
6.3.1 Beiträge zur Darstellung von <i>carba</i> -L-FMAU 27	105
6.3.2 Versuch der Darstellung von <i>carba</i> -L-FMAU 27 über die Fluorierung eines Nucleosids.....	108
6.3.3 Beiträge zur Synthese der 2'-fluorierten carbocyclischen Verbindung 128	123
6.3.4 Retrosyntheseschema zur Darstellung von <i>carba</i> -L-FMAU 27 über den Baustein 92	129
6.3.5 Auf dem Weg zu carbocyclischen 2'-modifizierten-Nucleosiden.....	147
7. Experimenteller Teil.....	153

7.1 Allgemeines	153
7.1.1 Lösungsmittel	153
7.1.2 Absolute Lösungsmittel.....	154
7.1.3 Enzyme und molekularbiologische Reagenzien.....	155
7.1.4 Phosphoramidite, DNA- und RNA-Oligonucleotide	155
7.1.5 Puffer und Lösungen	156
7.1.6 Chromatographische Analysen	157
7.1.7 Spektroskopie und Spektrometrie.....	159
7.1.8 Weitere Geräte	160
7.2 Molekularbiologische Methoden.....	161
7.2.1 Gelelektrophoretische Trennung und Reinigung der radioaktiv markierten Primer	161
7.2.2 Primer-Verlängerungs-Studien	162
7.3 Chemische Synthesen	165
8. Gefahrstoffverzeichnis.....	200
9. Literaturverzeichnis	205
10. Anhang.....	217
10.1 Synthese-Protokoll für unmodifizierte DNA	217
10.2 Weitere Autoradiogramme der <i>primer extension assays</i>	221
11. Danksagung	222
12. Eidesstattliche Versicherung	223

A Abkürzungsverzeichnis

%ee	Enantiomerenüberschuss
3TC	Lamivudin, Epivir [®]
9-BBN	9-Borabicyclo[3.3.1]nonan
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
ABC	Abacavir, Ziagen [®]
abs.	absolut
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrom
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AZT	Zidovudin, Retrovir [®]
Äquiv.	Äquivalente
ber.	berechnet
BOMCl	Benzyloxymethylchlorid
<i>carba</i>	carbocyclisch
CBV	Carbovir
CD	Circulardichroismus
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
CPG	<i>controlled pore glass</i> (engl.)
<i>cycloSal</i>	<i>cycloSaligenyl</i>
δ	chemische Verschiebung (NMR)
d	Dublett (NMR)
D ₂ O	Deuteriumoxid
d4T	Staduvir, Zerit [®]
DAST	Diethylaminoschwefeltrifluorid
DC	Dünnschichtchromatographie
DCA	Dichloressigsäure
DCI	4,5-Dicyanoimidazol
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dd	Dublett vom Dublett (NMR)
ddd	Dreifachdublett (NMR)
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DIAD	Diisopropylazidicarboxylat
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

DMSO- d_6	sechsfach deuteriertes Dimethylsulfoxid
DMTr	4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl
DNA	Desoxyribunucleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DP	Diphosphat
dT	2'-Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Ethylacetat
ESI	Elektronensprayionisation
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GC	Gaschromatographie
gef.	gefunden
h	Stunde
HAART	Hochaktive Anti-Retrovirale Therapie
HBV	Hepatitis B Virus
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (engl.)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (engl.)
HR	<i>High Resolution</i> (engl.)
HSV	Herpes Simplex Virus
<i>i</i> Bu	<i>iso</i> -Butyryl
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
<i>i</i> PrPac	<i>iso</i> -Propylphenoxyacetyl
IR	Infrarotspektroskopie
<i>J</i>	Skalare Kern-Kern Kopplungskonstante (NMR)
λ	Wellenlänge
μ	Mikro
m	Multiplett (NMR)
M	Molar
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption/ionization</i> (engl.)
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min.	Minute
MeOH	Methanol
min	Minute
MP	Monophosphat
mRNA	messenger RNA

MS	Massenspektrometrie
<i>N</i>	<i>Northern</i> (engl.)
nm	Nanometer
NMP	Nucleosidmonophosphat
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (engl.)
NRTI	Nucleosidischer Reverse Transkriptase-Inhibitor
nt	Nucleotid
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PE	Petrolether
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
ppm	Parts per million (NMR)
PS	Polystyrol
q	Quartett (NMR)
rac	racemisch
R_f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure
RP	<i>reversed phase</i> (engl.)
RT	Reverse Transkriptase
s	Singulett (NMR)
S	<i>Southern</i> (engl.)
S.	Seite
Smp.	Schmelzpunkt
t	Triplett (NMR)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDMSCI	<i>tert</i> -Butyldimethylsilylchlorid
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethylamin
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
tert.	tertiär
THF	Tetrahydrofuran
TIPDSCl ₂	1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetra <i>is</i> opropyldisiloxan

T _m	Schmelztemperatur
TOF	Time-of-flight
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TP	Triphosphat
U	Units
UV/Vis	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen / Volumen
W	Watt
WHO	World Health Organisation
w/w	Masse / Masse

1. Zusammenfassung

Die antimikrobielle Chemotherapie bedient sich derzeit erfolgreich struktureller Analoga natürlicher Nucleoside. Insbesondere bei der HIV-Therapie hat sich in den letzten Jahrzehnten speziell die Gruppe der nucleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren bewährt. Zu dieser gehört auch die Klasse der carbocyclischen Nucleosidanaloga. Das carbocyclische Nucleosid *D-carba-dT* ist solch ein Analogon, auf dessen Untersuchung ein Fokus der vorliegenden Arbeit liegt. *D-carba-dT* weist trotz der vorhandenen 3'-Hydroxylgruppe und seiner starken strukturellen Ähnlichkeit mit dem natürlichen DNA-Baustein Thymidin eine sehr gute antivirale Aktivität auf. In vorhergehenden Studien wurde ermittelt, dass nach dem Einbau des *D-carba-dT*-Bausteins in den DNA-Strang die virale DNA-Synthese über einen verzögerten Kettenabbruch, einen sogenannten *delayed chain termination* Wirkmechanismus, abbricht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Beiträge zur Klärung der Funktionsweise von *D-carba-dT* innerhalb dieses Wirkmechanismus geleistet.

Der erste Teil dieser Arbeit beinhaltete die erfolgreiche Darstellung des Ausgangsbausteins *D-carba-dT* über eine konvergente Synthesestrategie sowie des entsprechenden *D-carba-dT*-Triphosphats (über die *cycloSal*-Route). (siehe Kapitel 6.1.2.1 / 6.1.2.2)

Da *D-carba-dT* in den folgenden molekularbiologischen Untersuchungen auch als Baustein eines DNA-Oligonucleotids fungieren sollte, wurde zudem das carbocyclische *D-carba-dT*-Phosphoramidit synthetisiert. Darauf aufbauend gelang es, mittels Festphasensynthese die Darstellung dreier verschiedener, mit *D-carba-dT* modifizierter DNA-Oligonucleotide zu realisieren (30mere, Kapitel 6.1.2.2)

Mit diesen modifizierten Oligonucleotiden wurde daraufhin deren Einfluss auf die Schmelztemperatur und die Konformation des DNA-Duplexes untersucht, um einen Beitrag zur Aufklärung des Wirkmechanismus zu leisten. Durch die Bestimmung der Schmelztemperatur konnte gezeigt werden, dass der einfache Einbau den DNA-Duplex stabilisiert, wohingegen bereits der konsekutive Einbau der Modifikation zu einer Destabilisierung des Systems führt. (siehe Kapitel 6.1.3.1)

Des Weiteren ließen die Ergebnisse der Messung des Circularen Dichroismus den Rückschluss zu, dass die modifizierten DNA-Duplexe in der natürlich vorkommenden B-DNA-Konformation vorlagen: Die Einführung der *D-carba-dT* Einheit führte somit nicht zu einer veränderten globalen DNA-Konformation. (siehe Kapitel 6.1.3.2)

Parallel wurden Primer-Verlängerungsstudien (*primer extension assays*) mit D-*carba*-dT-Triphosphat als Substrat, sowie auch mit den modifizierten Oligonucleotiden (30mere, Templat) unter Verwendung der viralen Polymerase HIV-RT durchgeführt (siehe Kapitel 6.1.3.3). Aufgrund der Ergebnisse der durchgeführten *primer extension assays* wurden zentrale Erkenntnisse über die Funktionsweise des Wirkmechanismus von D-*carba*-dT erhalten. So konnte gezeigt werden, dass bei Vorlage eines RNA-Templats der Einbau des carbocyclischen Analogons in den wachsenden DNA-Primerstrang erfolgt und dessen vollständige Bildung zu beobachten ist. Wird das Analogon allerdings in Anwesenheit eines DNA-Templats in einen wachsenden DNA-Primerstrang inseriert, führt dies zu einem Abbruch der DNA-Synthese. Parallel wurde ersichtlich, dass die vorherige Base in der Sequenz vor der Inkorporation von D-*carba*-dT einen wesentlichen Einfluss auf den Abbruchmechanismus der DNA-Synthese nimmt. In A- bzw. T-haltigen Sequenzen war bevorzugt ein *immediate chain termination* Mechanismus zu beobachten, während bei Sequenzen bestehend aus G und C überwiegend ein *delayed chain termination* Wirkmechanismus festzustellen war.

Ist D-*carba*-dT-Monophosphat hingegen bereits Teil der Templatsequenz, so wird deutlich, dass auch die Anzahl an Modifikationen im Templatstrang Einfluss auf die DNA-Synthese der HIV-RT ausübt: Bei einer einfachen Modifikation wird der Primerstrang vervollständigt, wohingegen die DNA-Synthese nach einem *delayed chain termination* Wirkmechanismus abbricht, sobald die Modifikation mehrfach vorhanden ist.

Im Fall, dass die Modifikation bereits im Templatstrang vorliegt und parallel D-*carba*-dT-Triphosphat dem Assay als Substrat zur Verfügung gestellt wird, so wird die Modifikation im Templatstrang zunächst von der HIV-RT überwunden. Jedoch bricht die DNA-Synthese direkt nach dem Einbau von D-*carba*-dT-Triphosphat nach einem *immediate chain termination* Wirkmechanismus ab.

Darüber hinaus wurden Co-Kristallisationsstudien von modifizierten Oligonucleotiden (13mere) durchgeführt. Es zeigte sich unter anderem, dass im Vergleich zum natürlichen DNA-Baustein Thymidin eine geringfügig veränderte räumliche Orientierung der 3'-Hydroxylgruppe der carbocyclischen Modifikation vorliegt. Dies kann zu Veränderungen von intermolekularen Wechselwirkungen führen, welche einen potentiellen Einfluss auf den Abbruchmechanismus der DNA-Synthese ausüben können. (siehe Kapitel 6.1.3.4)

Parallel wurden *primer extension assays* mit humanen DNA-Polymerasen (β und γ) durchgeführt, die Hinweise auf die potentiell toxikologischen Eigenschaften des carbocyclischen Analogons liefern sollten. Die Ergebnisse zeigen zum einen, dass D-*carba*-dTTP als mögliches Substrat für die verwendeten humanen DNA-Polymerasen fungiert und damit nicht ausgeschlossen werden kann, dass davon eine Cytotoxizität ausgeht.

Zum anderen zeigen die durchgeführten Studien, dass die beiden humanen DNA-Polymerasen β und γ unter Verwendung modifizierter Templatstränge den Primerstrang nicht vervollständigen. (siehe Kapitel 6.1.3.5)

Ein weiterer Fokus dieser Arbeit lag auf der Entwicklung eines γ -modifizierten-Triphosphat-Prodrug-Konzepts (siehe Kapitel 6.2). Die aus den Prodrugs hervorgehenden antiviralen γ -modifizierten-Nucleosid-Triphosphate führten erfolgreich sowohl zu einer Differenzierung der Substratspezifität zwischen der viralen HIV-RT und den wirtseigenen Polymerasen, als auch zur Verhinderung einer schnellen Dephosphorylierung der Triphosphat-Nucleoside durch Phosphatasen.

Durch den Austausch einer spaltbaren Maskierungseinheit gegen eine nicht-spaltbare Gruppe bleiben die Hauptcharakteristika des ursprünglichen TriPPP-Konzepts zwar erhalten, jedoch stellt das γ -monoveresterte Nucleosidtriphosphat die antiviral aktive Verbindung dar und nicht mehr das Triphosphat. Neben dem Nachweis der antiviralen Eigenschaften dieser Verbindungen konnte in *primer extension assays* bewiesen werden, dass eine Inhibierung der DNA-Synthese von viralen Polymerasen erzielt wird (siehe Kapitel 6.2.2). Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass die humanen DNA-Polymerasen β und γ diese Verbindungen jedoch nicht als Substrate akzeptieren. Ein weiterer bedeutender Vorteil der γ -monoveresterten Triphosphatverbindungen ist, dass diese im Vergleich zu herkömmlichen Triphosphaten eine stark erhöhte Stabilität im CEM/0-Zellextrakt aufweisen und folglich eine längere Bioverfügbarkeit zeigen sollten. Durch deren ausbleibende Degradation (21 h) sollten zudem toxische Nebenwirkungen minimiert sein, da auch zumeist von den im Katabolismus entstehenden, weniger phosphorylierten Metaboliten toxische Effekte ausgehen können. (siehe Kapitel 6.2.2)

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Beiträge zur Darstellung von carbocyclischen 2'-modifizierten-L-Nucleosiden zu leisten. Als Referenzmolekül diente hierbei das ehemals als Wirkstoff zur Behandlung von Hepatitis B zugelassene L-FMAU. Aufgrund massiver Nebenwirkungen findet es zwar keine weitere Anwendung, ist jedoch aufgrund seines Wirkmechanismus von großem Interesse, da in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, dass es als kompetitiver Inhibitor der HBV-Polymerase wirkt. Im Vergleich zu natürlichen Nucleosiden wird für deren carbocyclische Analoga oft eine geringere Toxizität bei gleichbleibender antiviraler Aktivität beobachtet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher Beiträge zur Darstellung des carbocyclischen Analogons *carba*-L-FMAU geleistet. (siehe Kapitel 6.3)

Die Darstellung von *carba*-L-FMAU wurde über die Fluorierung eines Nucleosids ausgehend von Natriumcyclopentadienid angestrebt (12 Stufen). Diese Synthesesequenz führte jedoch nicht zum gewünschten Zielmolekül: So wurde beispielsweise das Nucleosid mit dem 2',3'-„*up*“-Diol erhalten anstelle des gewünschten 2',3'-„*down*“-Diols. Zusätzlich erfolgte die Fluorierung nicht an der 2'- sondern an der 5'-Position des Nucleosids. Die skizzierte Route führte somit nicht zum gewünschten Erfolg (siehe Kapitel 6.3.2).

Im letzten Abschnitt dieser Arbeit galt es, durch die Entwicklung einer allgemeinen Synthesestrategie einen stereoselektiven Zugang zur Darstellung von carbocyclischen 2'-modifizierten-L-Nucleosiden (bspw. *carba*-L-FMAU) zu schaffen. Hierfür wurden zunächst drei unterschiedliche Syntheserouten für die Darstellung des Schlüsselintermediates (1*S*,2*R*,3*S*,4*S*)-2,3-Benzylloxymethyl-4-(benzylloxymethyl)cyclopentanol bezüglich ihrer Effizienz getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die beiden ersten Routen (A acht Syntheseschritte, Gesamtausbeute 1.7%; B neun Syntheseschritte, Gesamtausbeute 8%) gegenüber der final etablierten Syntheseroute C schlechter waren. In nur fünf Syntheseschritten konnte (1*S*,2*R*,3*S*,4*S*)-2,3-Benzylloxymethyl-4-(benzylloxymethyl)-cyclopentanol (Gesamtausbeute 41%) mit Hilfe der Route C dargestellt werden. Dabei sind die einzelnen Synthesen ebenfalls in größeren Grammmaßstäben reproduzierbar. Daher ist der Aufbau des Schlüsselbauteins zur Darstellung der carbocyclischen 2'-modifizierten-Nucleoside nach Route C zu empfehlen. (siehe Kapitel 6.3.4)

Nach der erfolgreichen Darstellung von (1*S*,2*R*,3*S*,4*S*)-2,3-Benzylloxymethyl-4-(benzylloxymethyl)cyclopentanol konnte durch Invertierung der 1-Hydroxylgruppe letztlich das (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*)-2,3-Benzylloxymethyl-4-(benzylloxymethyl)cyclopentanol erhalten werden. Es wurden jedoch nur geringe Mengen dieses Moleküls erhalten, sodass es nicht gelang, die im Rahmen dieser Arbeit skizzierte Route zu beenden. Dies sollte jedoch aufgrund der bereits geleisteten Vorarbeiten zukünftig möglich sein. (siehe Kapitel 6.3.5)

2. Summary

Currently a variety of nucleoside analogues is successfully used in antimicrobial chemotherapy. Especially for the treatment of HIV, the therapeutic activity of the NRTI drug class is well established. Carbocyclic nucleosides are part of this drug class from which D-*carba*-dT is a representative and is in focus of the current work. Although D-*carba*-dT is a structural analogue of the natural deoxynucleoside thymidine, it shows promising antiviral activities despite its 3'-hydroxyl group. Previous studies already demonstrated that it blocks the viral DNA-synthesis by a unique mechanism named delayed chain termination. Further insights into the mode of action of D-*carba*-dT in this termination mechanism are provided within this thesis.

The successful synthesis of D-*carba*-dT as well as its corresponding triphosphate was the first step of the current study. In this context, D-*carba*-dT triphosphate was synthesized using the *cycloSal* technique. (please see chapter 6.1.2.1 / 6.1.2.2)

Since D-*carba*-dT should also be furthermore used as a DNA component in molecular biological investigations, the synthesis of the carbocyclic D-*carba*-dT phosphoramidite was conducted. Based on this molecule, three different DNA-oligonucleotides were successfully synthesized using solid phase syntheses, each bearing D-*carba*-dT as a DNA component (30mer, chapter 6.1.2.2). Contributing to the clarification of the targeted mode of action, the synthesized oligomers were investigated regarding their melting points (T_m -value). On the other hand, the conformation of the DNA double strand containing the D-*carba*-dT unit was in focus. By melting point analyses it was determined that the consecutive insertion of D-*carba*-dT led to a destabilization of the global DNA double helix while the single insertion resulted in a stabilization of the DNA duplex. The circular dichroism measurements led to the conclusion that the D-*carba*-dT containing DNA-DNA duplex occurs in natural B-DNA conformation: Consequently, the insertion of D-*carba*-dT did not alter the global DNA conformation. (please see chapter 6.1.3.1 / 6.1.3.2)

In parallel, *primer extension* assays were performed with D-*carba*-dT triphosphate as a substrate as well as using modified oligonucleotides (30mer) as templates in DNA-synthesis (chapter 6.1.3.3). As polymerase HIV-RT was chosen for these studies. The results obtained by the *primer extension* assays clearly indicate new insights in the role of D-*carba*-dT in the delayed chain termination mechanism. Initially it was shown that the carbocyclic analogue inhibits the elongation of the DNA-primer strand in a DNA/DNA-complex (primer/template), but not the elongation of the DNA-primer strand in a DNA/RNA-complex (primer/template).

Furthermore it became obvious that the nucleotide attached at the -1 position of the sequence also exerts influence on the termination mechanism: In most cases, the elongation of A- respective T-containing sequences terminated and thus following an immediate chain termination whereas the processing of C- and/or G-containing templates stopped due to a delayed chain termination mechanism, primarily.

If D-*carba*-dT was part of the DNA-template, the polymerase HIV-RT tolerated a single modification and the DNA-strand was fully elongated. Nevertheless, if the modification occurred repeatedly, the elongation stopped with increasing number of modification following a delayed chain termination mechanism.

However, if D-*carba*-dT triphosphate was offered as a substrate while D-*carba*-dT modified DNA-templates were used in parallel, the polymerase tolerated the modification of the template but terminated the DNA-synthesis right after incorporating D-*carba*-dT. Therefore the termination followed an immediate chain termination mechanism.

In parallel, co-crystallization studies of modified oligonucleotides (13mere) were performed. The results confirmed the structural similarity between the carbocyclic analogue and the natural thymidine. However, the studies also showed a minor alteration of the spatial orientation of the 3'-hydroxyl group of D-*carba*-dT monophosphate. Consequently, the altered interaction can affect the elongation of the DNA-strand and therefore might have an impact on the chain termination (please see chapter 6.1.3.4).

Additionally, possible toxicological properties were investigated using primer extension assays – D-*carba*-dTTP as a substrate and D-*carba*-dTMP as a part of the DNA-template. It was shown that D-*carba*-dTTP served as a substrate for the human DNA-polymerases β and γ . Therefore it cannot be excluded that D-*carba*-dTTP may exhibit cytotoxic effects. Using modified oligonucleotides as DNA-templates, the two different human DNA-polymerases β and γ showed similar properties. (please see chapter 6.1.3.5)

Furthermore, this thesis was aimed developing a concept of γ -modified-triphosphates as prodrugs on the basis of the known TriPPPPro-concept - an improved substrate specificity of γ -modified-triphosphates towards viral versus host enzymes was achieved. Additionally their reduced susceptibility to de-phosphorylation was successfully demonstrated.

For this purpose an improved TriPPPPro-concept was provided: One mask being intracellularly cleavable while the other mask is stable, whereas the further main characteristics of the established TriPPPPro-concept remain unchanged. However, within the newly developed methodology the antiviral component is the γ -monoesterified molecule, whilst previously the triphosphate acted as antiviral.

Besides the evidence of the antiviral activity of γ -modified-triphosphates their inhibition of the DNA-synthesis by the viral polymerase HIV-RT was successfully shown in *primer extension* assays (chapter 6.2.2). In contrast, human DNA-polymerases β and γ did not accept γ -modified-triphosphates as substrates. Comparing the newly introduced γ -modified triphosphates with traditional triphosphates their increased stability towards intracellular degradation became obvious (stable for 21 h in CEM/0 cell extract). This may lead to an increased bioavailability. Additionally, toxic side effects should be decreased as these might also be caused by degraded metabolites with a lower degree of phosphorylation.

Another major objective of this work was the contribution to the preparation of carbocyclic 2'-modified-L-nucleosides. In this case, L-FMAU as a former approved active compound for the therapy of hepatitis B, served as a model. Although L-FMAU is no longer used on the market due to its massive side effects, its mode of action is still of high interest. Previous studies demonstrated its functionality as a competitive inhibitor of the HBV-polymerase. Since it was postulated that carbocyclic analogues show a consistent antiviral activity and a reduced toxicity compared to their natural counterparts, the current work aimed providing a contribution to the synthesis of the carbocyclic analogue *carba*-L-FMAU. (please see chapter 6.3)

The synthesis of *carba*-L-FMAU should be realized within 12 steps, starting with sodium cyclopentadienide and subsequent fluorination of the nucleoside. Nevertheless, the reaction sequence did not lead to the target molecule: Instead of the nucleoside containing a "down"-diol, the "up"-diol nucleoside was obtained. Additionally, the fluorination did not occur at the 2'-position of the nucleoside as demanded but occurred at its 5'-position. In conclusion, the designed reaction sequence did not succeed and needs to be optimized regarding the mentioned drawbacks. (please see chapter 6.3.2)

The last section of the current work focused on the development of a more general synthetic strategy to gain a stereoselective access to the synthesis of carbocyclic 2'-modified-L-nucleosides (as e.g. *carba*-L-FMAU). In this regard, three different synthetic routes for the preparation of the key intermediate (1*S*,2*R*,3*S*,4*S*)-2,3-benzyloxymethyl-4-(benzyloxymethyl)cyclopentanol were evaluated. It was shown that route **A** and **B** exhibited inferior characteristics (**A** eight steps, overall yield 1.7%; **B** nine steps, overall yield 8%) compared to Route **C**. However, using route **C** the molecule (1*S*,2*R*,3*S*,4*S*)-2,3-benzyloxymethyl-4-(benzyloxymethyl)cyclopentanol was successfully synthesized with an excellent overall yield of 41% over five steps. It should be noted that every single step is even realizable on a larger scale. Hence, route **C** is finally recommended for the synthesis of the key intermediate leading to carbocyclic 2'-modified-L-nucleosides. (please see chapter 6.3.4)

Following the successful synthesis of (1*S*,2*R*,3*S*,4*S*)-2,3-benzyloxymethyl-4-(benzyloxymethyl)cyclopentanol also the synthesis of (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*)-2,3-benzyloxymethyl-4-(benzyloxymethyl)cyclopentanol succeeded via an inversion of the hydroxyl function. Due to the obtained low quantity of this final molecule the completion of the designed route was not achieved but should be realizable in future studies based on the already provided assistance. (please see chapter 6.3.5)

3. Einleitung

Die Weltbevölkerung wird bis Mitte des 21. Jahrhunderts voraussichtlich auf mehr als 9 Milliarden Menschen anwachsen.^[1] Gleichzeitig zieht es die Menschen immer mehr in die Städte. Die daraus resultierende hohe Bevölkerungsdichte in Ballungszentren lassen das Risiko der Verbreitung u.a. von viralen Krankheitserregern signifikant ansteigen. Bereits in der heutigen Zeit stellt die Resistenzfähigkeit von Krankheitserregern die Forschung vor Schwierigkeiten: zunehmend mehr Erreger sind gegen etablierte Virostatika resistent. Demzufolge ist die Entwicklung von neuen antiviralen Wirkstoffen und Therapien ein gesellschaftlich hochrelevanter Bestandteil der medizinischen Forschung.

Heutzutage zählen neben Herzerkrankungen und Malignomen insbesondere virale Infektionen weltweit zu den häufigsten Todesursachen. Beispielsweise waren nach Schätzung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) im Jahre 2015 weltweit etwa 36.7 Millionen Menschen mit dem HI-Virus infiziert, wobei 2.0 Millionen Neuinfektionen verzeichnet wurden.^[2] Außerdem starben etwa 1.1 Millionen Menschen an den Folgen der Infektion.^[2] Erstmals trat diese Infektionskrankheit, die mit einer Schwächung des menschlichen Immunsystems einherging, in den 1920er-Jahren in der Demokratischen Republik Kongo auf.^[3] Die Charakterisierung und Isolierung des dafür ursächlichen HI-Virus erfolgte 1983 durch MONTAGNIER und GALLO.^[4] Das HI-Virus gehört zu der Familie der Retroviren und kann zur erworbenen Immunschwächekrankheit (*acquired immune deficiency syndrome*, AIDS) führen.^[5]

Nach Angaben der WHO zählt auch Hepatitis-B (HBV) zu den weltweit häufigsten Infektionskrankheiten.^[6] Die Entdeckung und Isolierung eines Antigens des DNA-Virus erfolgte 1965 durch BLUMBERG.^[7] Diese Entdeckung ermöglichte die Entwicklung von HBV-Schnelltests sowie Impfstoffen gegen den Virus. Dennoch ist die Infektionsrate laut der Daten der WHO nur leicht regressiv: Im Jahre 2015 waren noch 257 Millionen Menschen chronisch an Hepatitis B erkrankt, wovon jährlich 887 000 an den Folgen einer Leberzirrhose oder an einem Leberkarzinom sterben.^[6]

Basierend auf dem bis heute erlangten Verständnis über den Aufbau sowie den Replikationszyklus der Virionen (u.a HIV und HBV), gelingt es der modernen Medizin wirksame Virostatika in den unterschiedlichsten Therapieansätzen anzubringen.

Beispielsweise hat sich seit 1996 die „Hochaktive antiretrovirale Therapie“ (HAART), heute bekannt unter *combination antiretroviral therapy* (cART), als wichtigste Therapieform gegen HIV etabliert.^[8,9]

Diese Kombinationstherapie besteht aus mindestens drei antiretroviralen Wirkstoffen. Je nach Wirkstoffzusammensetzung zielt diese Therapieart auf die Inhibierung der viralen HIV-Reversen Transkriptase (HIV-RT), der viralen Protease oder der viralen Integrase.^[10] Alle drei Enzyme nehmen eine entscheidende Rolle in der Replikation des HI-Virus ein. Als HIV-RT Inhibitoren haben sich in der HIV-Therapie besonders Nucleosidanaloga hervorgetan. Unter den 31 zugelassenen Anti-HIV-Medikamenten befinden sich zwölf Nucleosidanaloga (in Einzel- sowie in Kombipräparaten).^[11] Diese sind aufgrund der Unspezifität der viralen HIV-RT in der Lage, mit den natürlichen Nucleosiden zu konkurrieren und auf diese Weise in der DNA-Synthese der viralen RT als nucleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) eingebaut zu werden.^[12,13,14]

Der Wirkmechanismus solcher Nucleosidanaloga basiert im Fall von HIV u.a. auf der kompetitiven Hemmung der viralen RT. Bei klassischen Analoga fehlt die 3'-Hydroxylgruppe, sodass nach dem Einbau eines NRTIs der Abbruch der reversen Transkription herbeigeführt wird, da keine weitere Phosphordiesterbindung mit dem folgenden Nucleotid gebildet werden kann (Abbildung 1).^[15,16] Dieser Mechanismus wird als *immediate chain termination* bezeichnet.^[17,18]

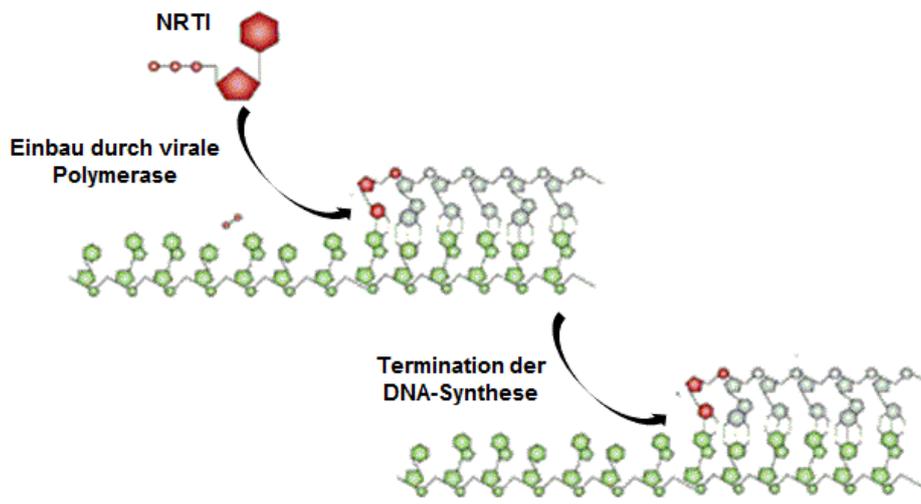


Abbildung 1: Abbruch der viralen DNA-Synthese.^[15]

Generell wird die Anwendung von Nucleosidanaloga in der Therapie erst durch eine fehlende Korrekturlesefunktion (*proofreading*-Funktion) der viralen RT möglich.^[19,20] Allerdings kommt es, aufgrund der fehlenden *proofreading*-Funktion der HIV-RT und der hohen Fehlerrate von viralen Polymerasen, zu Fehleinbauten, sogenannten Punktmutationen. Auftretende Punktmutationen können dann in der Folge zur Bildung von Resistenzen gegen diese Klasse an Virostatika führen. Beispielsweise sind für das HI-Virus zwei unterschiedliche Resistenz-Mechanismen bekannt.

Bei dem *exclusion*-Mechanismus besitzt die virale Polymerase die Fähigkeit, zwischen einem natürlichen Substrat und einem NRTI zu unterscheiden, sodass keine Insertion des Wirkstoffs erfolgt.^[21,22] Im Gegensatz dazu, wird nach *excision*-Mechanismus das bereits eingebaute Analogon an der terminalen 3'-Position wieder entfernt.^[23,24]

Unter dem Aspekt, dass Nucleosid- sowie Nucleotidanaloga nicht nur in der HIV-Therapie, sondern auch bei Hepatitis B Behandlungen eingesetzt werden und einen hohen Stellenwert aufgrund der vermehrt auftretenden Resistenzbildungen gegen antivirale Wirkstoffe haben, wurde in den letzten Jahren eine neue Klasse an NRTIs entwickelt. Das Charakteristikum dieser neuen Klasse ist, dass die zugehörigen Moleküle trotz des Vorhandenseins einer 3'-Hydroxylfunktion einen inhibitorischen Effekt aufweisen. Die Termination der DNA-Synthese basiert auf dem Wirkmechanismus eines verzögerten Kettenabbruchs (*delayed chain termination*). Nach Insertion des Analogons in den zu verlängernden Strang können weitere Nucleotide eingebaut werden, bevor eine verzerrte Konformation der DNA, die durch das Analogon hervorgerufen wird, für einen Abbruch der DNA-Synthese sorgt.^[25]

4. Kenntnisstand

4.1 Biologisch aktive Nucleosidanaloga

Im Bereich der antimikrobiellen Chemotherapie werden strukturelle Analoga der natürlichen Nucleoside eingesetzt. Nucleosidanaloga zeichnen sich durch Modifikationen an der Nucleobase und/oder dem (Desoxy-)Ribosegerüst aus. Um jedoch biologisch eine Aktivität aufzuweisen, müssen die Nucleosidanaloga intrazellulär durch Enzyme der infizierten Zelle in das Nucleosidtriphosphat phosphoryliert werden.

Der erste Nachweis des Inhibierungspotentials eines Nucleosidanalogons erfolgte durch FURMAN im Jahre 1986. Er wies nach, dass 3'-Azidothymidin-Triphosphat gegenüber dem viralen Enzym HIV-RT ein Inhibierungspotenzial besitzt.^[26] Im darauffolgenden Jahr wurde bereits das Nucleosidanalogon 3'-Azidothymidin (AZT, Zidovudin) **1** durch die FDA als Virostatikum zugelassen. In der weiteren Entwicklung wurde eine hohe Anzahl an NRTI dargestellt, die strukturelle Unterschiede zueinander, aber auch zu den natürlichen DNA-Bausteinen aufweisen. Bezeichnend für die potenzielle Vielfalt an Analoga kann das acyclische Tenofovir **2** angeführt werden, welches als Disoproxylyfumarat zur Behandlung von HIV-1 und Hepatitis B verabreicht wird.^[27,28]

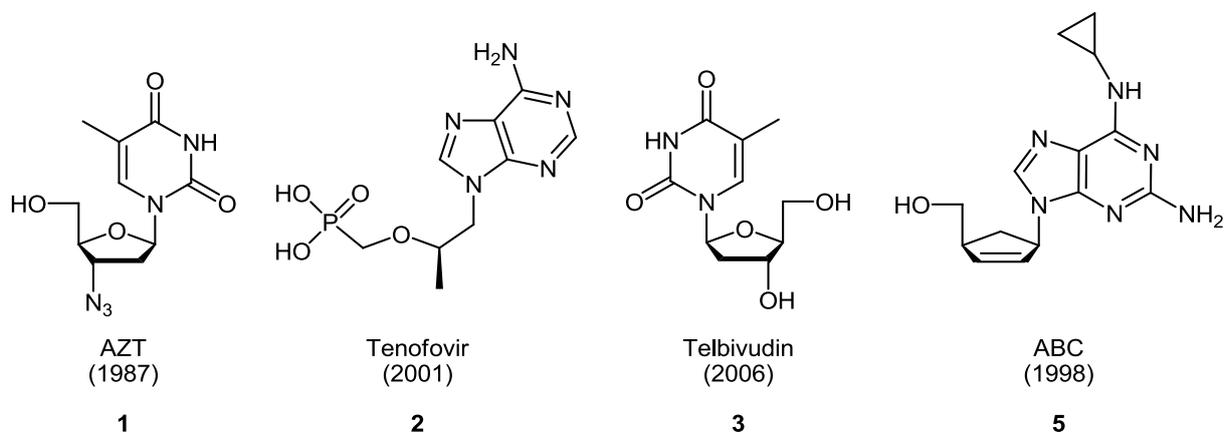


Abbildung 2: Zugelassene Nucleosidanaloga.

Die Wirksamkeit der Nucleosidanaloga ist von ihrer Fähigkeit abhängig, die natürlichen Nucleoside vor allem in Hinblick auf deren Wechselwirkung mit viralen und zellulären Enzymen zu imitieren. Aufgrund dessen bestand die Annahme, dass nur die D-Analoga der natürlich vorkommenden D-Nucleoside eine therapeutische Wirkung aufweisen können.

Doch konnte nachgewiesen werden, dass auch L-Nucleoside eine antivirale Aktivität besitzen: Beispielsweise konnte ermittelt werden, dass Telbivudin (L-dT) **3** gegen das Hepatitis B-Virus eine antivirale Aktivität aufweist.^[29] Nach Feststellung der antiviralen Aktivität von L-Nucleosiden, erfolgte ein immenser Fortschritt in der Entwicklung antiviraler Wirkstoffe. Besonders ist, dass die unnatürlichen L-Analoga im Vergleich zu den natürlichen D-Nucleosidanaloga eine höhere metabolische Stabilität besitzen, die dazu führt, dass L-Nucleosidanaloga häufig eine besser antivirale Wirkung als natürlich vorkommenden D-Enantiomere aufweisen.^[30] Hinzu kommt, dass L-Nucleosidanaloga zumeist eine geringere Toxizität zeigen.^[30]

Im Jahre 1994 konnte MERLO durch *in vitro* Studien erstmals bestätigen, dass das carbocyclische L-Carbovir in Form des Triphosphats **4** eine deutlich höhere antivirale Aktivität gegenüber HIV als das D-Analogon besitzt.^[31] Aufgrund seiner moderaten Bioverfügbarkeit wird dieser potente Anti-HIV-Wirkstoff jedoch nicht in der Therapie eingesetzt.^[31] Generell findet sich innerhalb der letzten Jahre ein stetiger Zuwachs an carbocyclischen Verbindungen in der Auflistung von antiviralen Wirkstoffen, wie z.B. Abacavir (ABC) **5**, wieder.^[32]

4.2 Carbocyclische Nucleosidanaloga

Die Substanzklasse der carbocyclischen Nucleoside basiert auf dem isosterischen Austausch des Sauerstoffatoms im Glycon durch eine Methylen-Einheit (Abbildung 3).^[33]

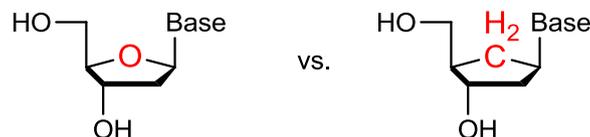


Abbildung 3: Vergleich von 2'-Desoxynucleosiden (links) mit carbocyclischen Nucleosiden (rechts).

Dieser Austausch bewirkt u.a., dass die labile glycosidische Bindung keinem enzymatischen und hydrolytischen Abbau unterliegt. Bei dem katabolen Abbau im menschlichen Organismus werden überschüssige Nucleoside, wie z.B. das 2'-Desoxyguanosin **6**, durch die humane Nucleosid-Phosphorylase unter phosphorolytischer Spaltung der *N*-glycosidischen Bindung in die freie Nucleobase **7** und das 2'-Desoxyribose-1-Phosphat **8** überführt (Abbildung 4).^[34]

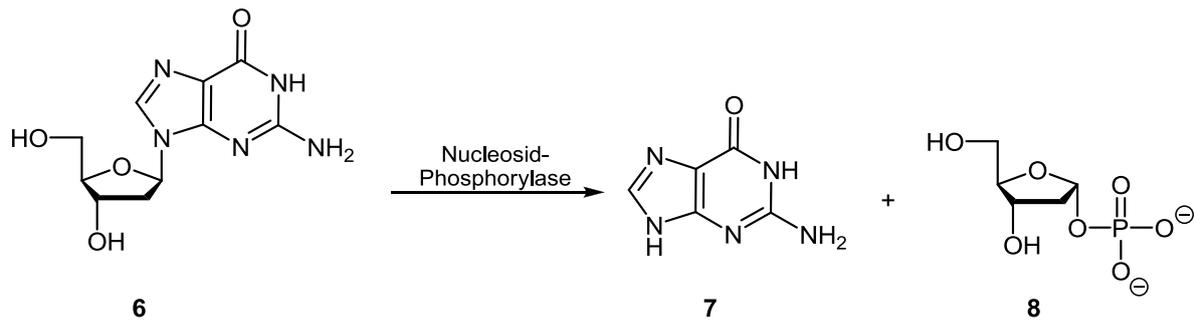


Abbildung 4: Enzymatische Spaltung der *N*-glycosidischen Bindung des Nucleosids **6**.^[34]

Bedingt durch die fehlende Aminalstruktur und dem damit einhergehenden Ausbleiben der phosphorolytischen Spaltung der *N*-glycosidischen Bindung, erhöht sich die Halbwertszeit und somit die Bioverfügbarkeit der carbocyclischen Nucleosidanaloga im Organismus. Durch Einführung einer Methylengruppe in das System wird gleichermaßen die chemische Stabilität sowie die Lipophilie erhöht.^[34,35,36]

4.3 Bioaktive carbocyclische Nucleosidanaloga

Innerhalb der letzten Jahrzehnte konnten zahlreiche carbocyclische Nucleoside isoliert oder synthetisiert werden, welche eine antivirale, antibiotische oder eine antitumorale Aktivität aufweisen.

Als erstes natürlich vorkommendes carbocyclisches Nucleosid wurde im Jahre 1968 Aristeromycin **9** isoliert und charakterisiert.^[37] Das carbocyclische Nucleosid Neplanocin A **10**, welches 1981 aus dem Bakterium *Ampullariella regularis* gewonnen wurde, zeigte ebenfalls antivirale Aktivitäten gegen unterschiedliche Virustypen, wobei zusätzlich eine antitumorale Wirkung festgestellt werden konnte.^[38,39,40] Die antivirale Wirkung von Neplanocin A **10** ist dabei zu einem Teil auf die Inhibition der viralen S-Adenosylhomocysteinase zurückzuführen.^[41] Trotz vielversprechender biologischer Aktivitäten ist eine therapeutische Anwendung von Neplanocin A **10** aufgrund der hohen Toxizität jedoch nicht möglich.^[42]

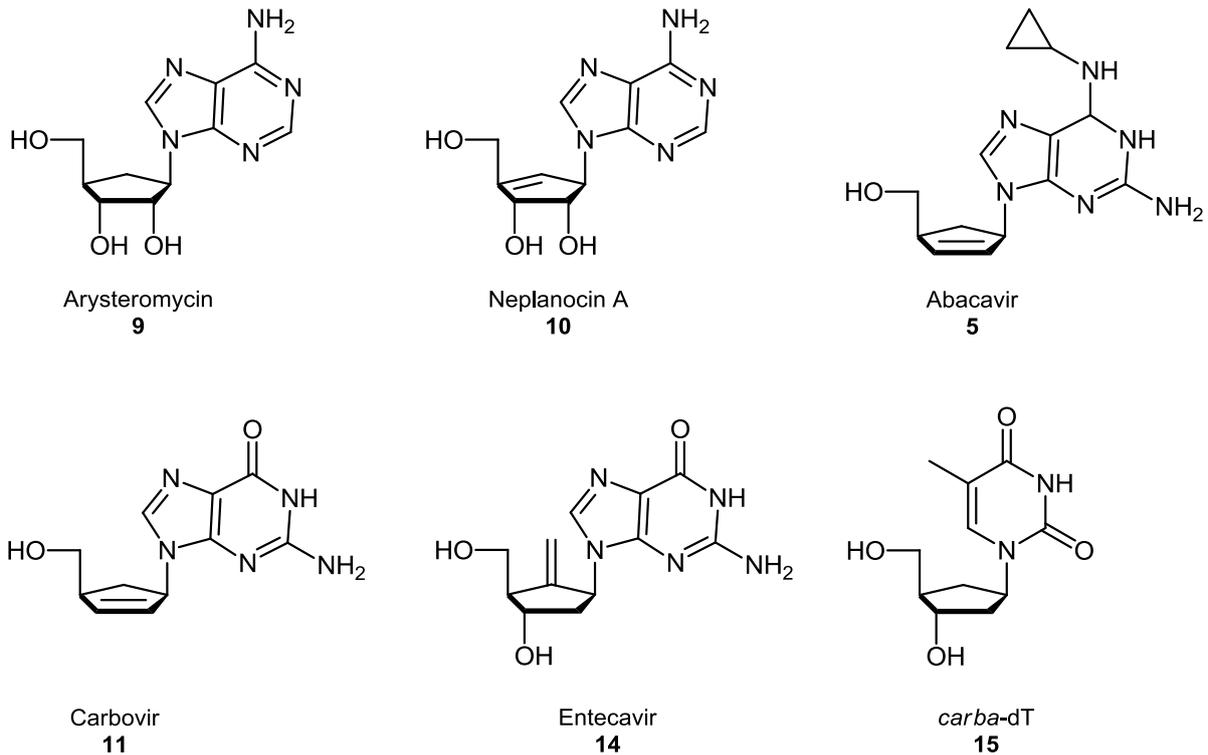
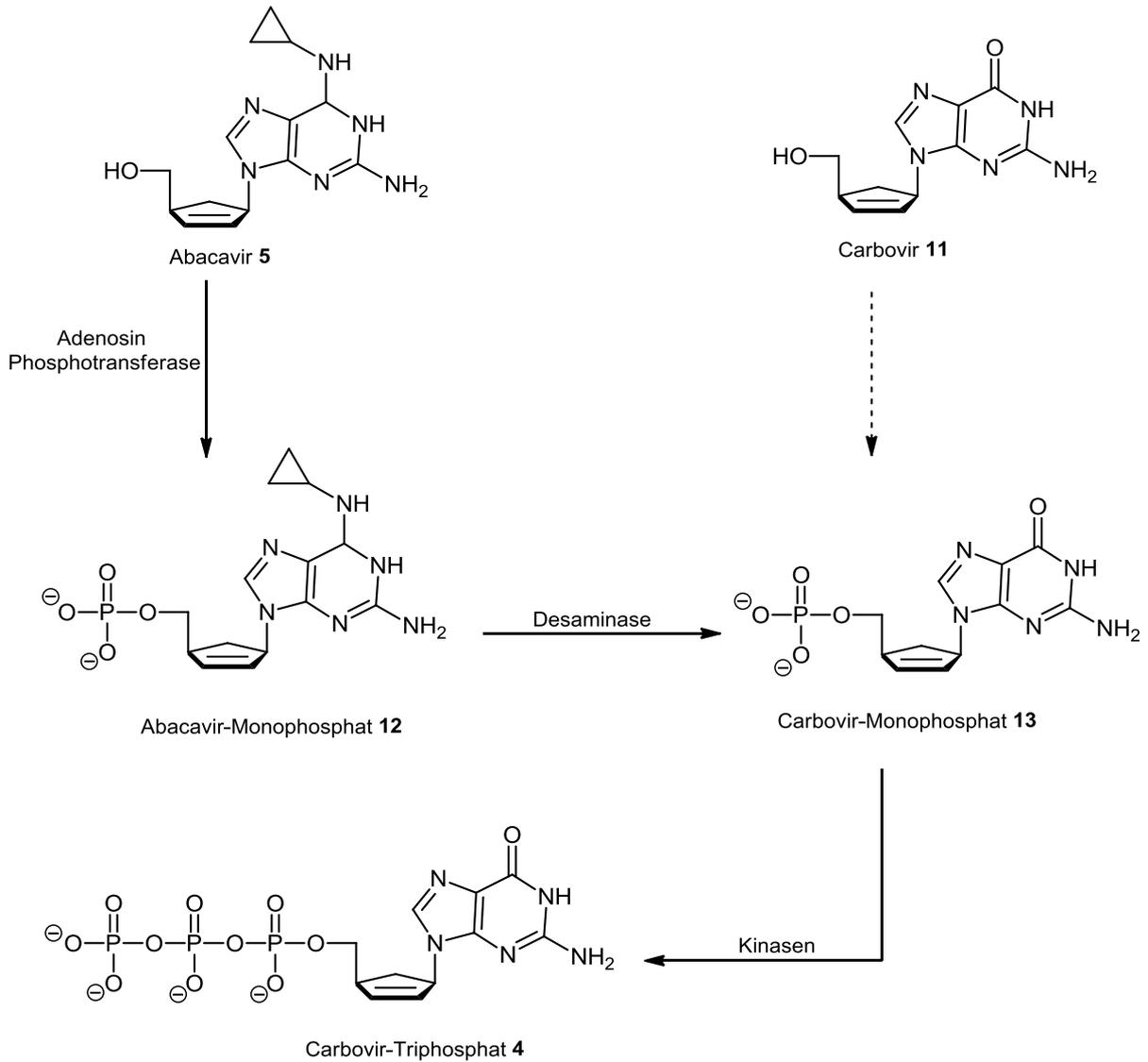


Abbildung 5: Bioaktive carbocyclische Nucleosidanaloga.

Im Gegensatz zu Neplanocin A **10** verliefen die klinischen Studien bei Abacavir (ABC) **5** erfolgreich, sodass dieser Wirkstoff im Jahre 1998 von der FDA zur Behandlung von HIV zugelassen wurde.^[43] Hier sei erwähnt, dass eine direkte Verabreichung von Carbovir **11** aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit sowie der zu hohen Toxizitätswerte bei *in vivo* Studien nicht erfolgen kann.^[44,45]

Der intrazelluläre Metabolismus von ABC **5** zum biologisch aktiven Triphosphat soll im Folgenden kurz vorgestellt werden (Abbildung 6): Die intrazelluläre Phosphorylierung beginnt mit einer Umwandlung zum entsprechenden ABC-Monophosphat (ABCMP) **12**. Durch enzymatische Desaminierung von ABCMP **12** wird das Carbovir-Monophosphat **13** generiert, welches im weiteren Verlauf durch schrittweise Phosphorylierung mittels geeigneter Kinasen zum bioaktiven Carbovir-Triphosphat **4** umgesetzt wird.^[46] Einsatz findet ABC **5** überwiegend in Kombinationspräparaten wie Trizivir[®] und Epzicom[®].^[11] Allerdings hat der Einsatz von ABC **5** den Nachteil, dass das Risiko einer Resistenzbildung verhältnismäßig hoch ist. Neben den Punktmutationen, wie K65R oder Y115F, treten unter anderem Kreuzresistenzen zu dem zugelassenen Analogon Lamivudin (3TC) auf.^[47]

Abbildung 6: Metabolismus von Carbovir 11 und Abacavir 5.^[44]

Das carbocyclische Purin-Analogon Entecavir 14 erhielt die Zulassung von der FDA als Virostatikum im Jahr 2005. Trotz der 3'-Hydroxyfunktion weist auch Entecavir 14 eine antivirale Aktivität auf und wird zur Behandlung von Hepatitis B eingesetzt. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass auch eine antivirale Aktivität gegenüber HIV, HSV-1, VZV und Influenza gegeben ist.^[49] Dieses carbocyclische Analogon 14 gehört zu der Klasse an NRTI, die die DNA-Synthese der viralen Polymerase durch *delayed chain termination* Mechanismus inhibiert.^[50]

Im Jahre 1976 wurde durch SHEALY erstmals das carbocyclische Analogon *carba*-dT **15** als racemisches Gemisch dargestellt.^[51] In einer von BÈRES durchgeführten Studie stellte sich heraus, dass *D*-*carba*-dT **16** eine antivirale Aktivität gegen HIV-1 infizierte MT-4-Zellen aufweist.^[52] Dieses Nucleosid inhibiert ebenfalls die virale Polymerase nach einem *delayed chain termination*, obwohl für *D*-*carba*-dT **16** die genaue Funktion innerhalb dieses Wirkmechanismus noch ungeklärt ist.^[53]

Zusätzlich berichtete BÈRES in dieser Studie neben einer *minimum inhibitory concentration* (MIC-Wert) von 0.07 µg/mL auch von einer hohen Cytotoxizität (0.1-1 µg/mL).^[52] In späteren Studien sollten die Cytotoxizität jedoch widerlegt werden, denn eine Überprüfung der antiviralen Eigenschaften von *D*-*carba*-dT **16** bestätigte zwar die antivirale Aktivität dieser Verbindung, aber nicht deren Cytotoxizität.^[54]

Das Potential der antiviralen Eigenschaften von *D*-*carba*-dT **16** konnte in einer weiterführenden Studie nachgewiesen werden, in welcher u.a. gegen die *multidrug-resistance*-Klone (MDR) E2-2 und 8ka3 getestet wurde. Diese *multidrug-resistance*-Klone weisen eine definierte Mutation gegen klinisch verwendete Anti-HIV-Wirkstoffe auf.^[55] Trotzdem konnte bei den Untersuchungen festgestellt werden, dass die Replikation des MDR Klons E2-2 mit einem IC₅₀-Wert von 0.03 µM von *D*-*carba*-dT **16** inhibiert wird. Gegen den zweiten MDR Klon 8ka3 konnte mit einem IC₅₀-Wert von 0.14 µM ein leicht geringerer, aber dennoch inhibierender Effekt nachgewiesen werden.^[55]

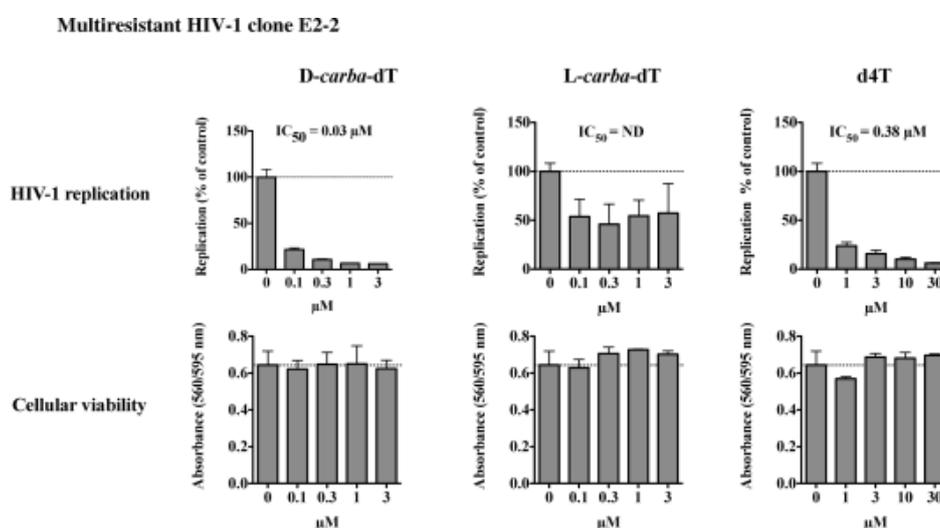


Abbildung 7: Graphische Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse des MDR-Klons E2-2.^[55]

4.5 Bioaktivierung von Nucleosiden und Nucleosidanaloga

Ausgehend vom Nucleosid entsteht über eine intrazelluläre Phosphorylierungskaskade das biologisch aktive Nucleosid-5'-Triphosphat. Dabei wird, wie in Abbildung 10 gezeigt, die schrittweise Bildung der entsprechenden Mono-, Di- und Triphosphate durch zelluläre Kinasen katalysiert.^[63] Diese Kaskade gilt sowohl für die natürlichen Nucleoside als auch für die Nucleosidanaloga. Die Umsetzung eines Nucleosids zum Nucleosid-5'-monophosphat wird von spezifischen Enzymen des *salvage pathway* katalysiert (Abbildung 10, Schritt A), zu dem beispielsweise die Thymidinkinase zählt.^[64] Die Phosphorylierung zum Diphosphat erfolgt durch weniger spezifische Kinasen (B).^[65] Um die biologische Aktivität zu erhalten, muss im letzten Schritt (C) der Kaskade bspw. die vergleichsweise wenig spezifische Nucleosiddiphosphatkinase das Diphosphat zum Triphosphatmetaboliten umwandeln.^[66]

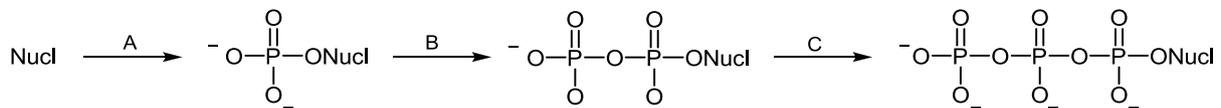


Abbildung 10: Enzymatische Phosphorylierung von Nucleosid(analoga) zum biologisch aktiven Nucleosid(analoga)triphosphat.

Allerdings werden bevorzugt diejenigen Nucleoside von Kinasen phosphoryliert, die in der *Southern*-Konformation vorliegen.^[53] In Lösung stellt sich bei den natürlichen Vertretern der 2'-Desoxynucleoside ein Gleichgewicht zwischen zwei Twist-Konformationen (*Northern*-, *Southern*-Konformation, Abbildung 11) ein. Begünstigt werden die beiden Twist-Konformationen durch den anomeren Effekt und die *gauche* Wechselwirkung zwischen dem Ringsauerstoffatom und der 3'-Hydroxylgruppe (Abbildung 11).^[67]

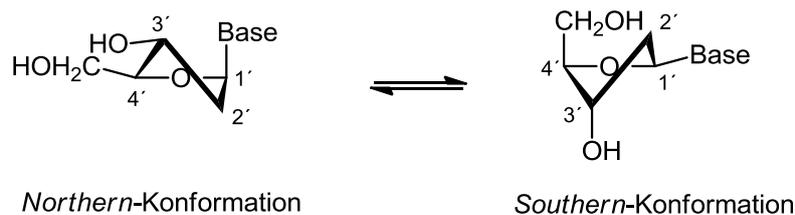
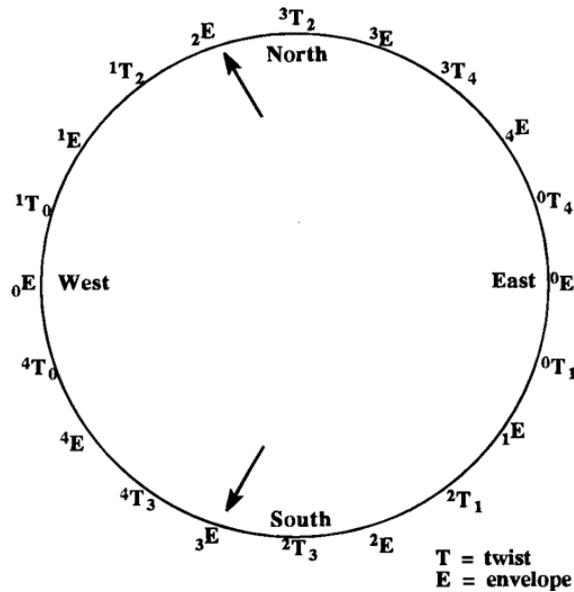
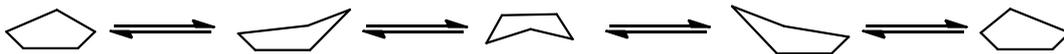


Abbildung 11: Die Twist-Konformationen der 2'-Desoxynucleoside.^[18]

In dem abgebildeten Pseudorotationscyclus entspricht eine absolute *Northern*-Konformation einem Winkelbereich von 2E über 3T_2 nach 3E . Im Gegensatz dazu liegt im Winkelbereich von 2E über 2T_3 nach 3E eine *Southern*-Konformation vor (Abbildung 12).^[67]

Abbildung 12: Pseudorotationscyclus.^[67]

Im Gegensatz zu den natürlichen Vertretern der 2'-Desoxynucleoside stellen carbocyclische Nucleoside Derivate des Cyclopentans dar und besitzen anstelle des Ringsauerstoffs eine Methylengruppe. Diese sorgt dafür, dass das unsubstituierte Cyclopentan bevorzugt die *Envelope*-Konformation einnimmt, wobei nur ein C-Atom aus der Ebene hervorsteht. Diese Faltung ist jedoch nicht fixiert. Die Fluktuation sorgt dafür, dass jedes Kohlenstoffatom die „Briefumschlagspitze“ darstellen kann (Abbildung 13). Dieses Verhalten wird als Pseudorotation bezeichnet.^[68]

Abbildung 13: *Envelope*-Konformation des unsubstituierten Cyclopentans.

Entgegen den natürlichen Nucleosiden weist der Cyclopentanring neben der *Envelope*-Konformation noch mehrere *Twist*-Konformationen auf, die sich über den Pseudorotationscyclus verteilen. Durch sterische Wechselwirkungen der substituierten Cyclopentanringe kann die Pseudorotation aufgehoben werden, sodass, abhängig von den Substituenten, eine definierte „*Lock*“-Konformation bevorzugt wird.^[69]

Beispielsweise wird bei *D-carba*-dT **16** durch die Substitution des Cyclopentanrings mit der Nucleobase Thymin eine Konformation präferiert, welche einem Kompromiss aus der *Northern*- und der *Southern*-Konformation entspricht (Abbildung 14). Dennoch ist davon auszugehen, dass *D-carba*-dT **16** ein akzeptables Substrat für die Kinasen und Polymerasen darstellt, da die Flexibilität des Cyclopentanrings kleine Konformationsänderungen erlauben sollte.^[53]

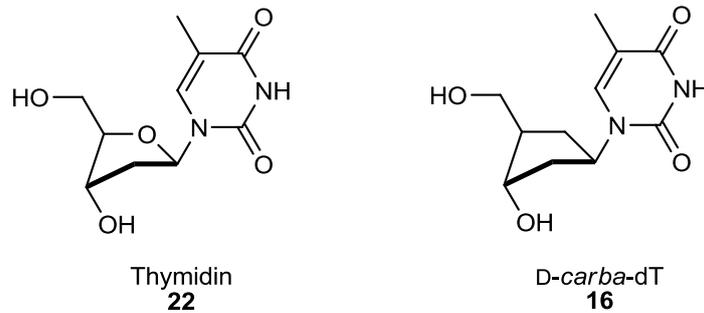


Abbildung 14: Vergleich von Thymidin **22** (links) und *D-carba*-dT **16** (rechts) hinsichtlich ihrer Konformation.^[53]

Um die Auswirkungen von *D-carba*-dT **16** auf DNA-Ebene zu untersuchen, wurde zunächst in biochemischen Assays überprüft, inwieweit *D-carba*-dT **16** einer intrazellulären Metabolisierung durch zelluläre Kinasen unterliegt. In diesen biochemischen Assays konnte BOYER zeigen, dass das carbocyclische Analogon **16** in die Triphosphatform überführt wird und somit als Substrat im HIV-Replikationszyklus zur Verfügung steht, wodurch es potentiell als antiviraler Wirkstoff dienen kann.^[53]

4.6 Das Prodrug-Konzept

Obwohl heutzutage der synthetische Zugang zu Nucleosidtriphosphaten gegeben ist, ist eine direkte Anwendung der phosphorylierten Metabolite der Nucleosidanaloga als Arzneimittel nicht möglich. Diese liegen bei physiologischem pH-Wert als hochpolare Anionen vor, wodurch keine Membranpermeabilität gegeben ist. Ferner kann es im Blut durch unspezifische Phosphatasen zur Dephosphorylierung der Nucleotidanaloga kommen.

Um dennoch phosphorylierte Metabolite antiviraler Nucleosidanaloga der infizierten Zelle zuzuführen, ist der Einsatz eines lipophilen, membrangängigen Prodrugs erforderlich. Prodrugs sind modifizierte und pharmakologisch inaktive Wirkstoffvorläufermoleküle, die durch einen spezifischen und möglichst hochselektiv verlaufenden Mechanismus intrazellulär die entsprechenden phosphorylierten Formen freisetzen.^[70] Bei Anwendung von so einem Prodrug-Konzept können z.B. verschiedenste Barrieren (z.B. Zellmembran) überwunden werden.

Im Hinblick auf eine Verbesserung der Wirksamkeit von Virostatika sind zahlreiche Prodrug-Konzepte entwickelt worden, die eine Maskierung der Phosphat-Einheiten durch lipophile Substituenten ermöglichen.^[71] TILMANN SCHULZ und TRISTAN GOLLNEST gelang es schließlich, das Bis(acyloxybenzyl)-Diphosphat-Prodrug-Konzept (DiPPro-Konzept) auf die Maskierung von Triphosphaten zu übertragen.^[72,73,74,75] In Analogie zu dem DiPPro-Konzept werden bei dem Bis(acyloxybenzyl)-Triphosphat-Prodrug-Konzept (TriPPPro-Konzept) die Ladungen an der terminalen Phosphatgruppe (γ -Phosphat) durch zwei durch enzymatisch spaltbare Gruppen maskiert. Um eine Repulsion der Enzyme mit den verbliebenen negativen Ladungen der Phosphat-Einheiten zu vermeiden, wurde erneut auf die Verwendung von 4-Hydroxybenzylalkohol als Spacer zurückgegriffen, sodass die enzymatisch spaltbare Esterfunktion eine ausreichende Distanz zu besagten negativen Ladungen aufweist.^[72,73,74,75]

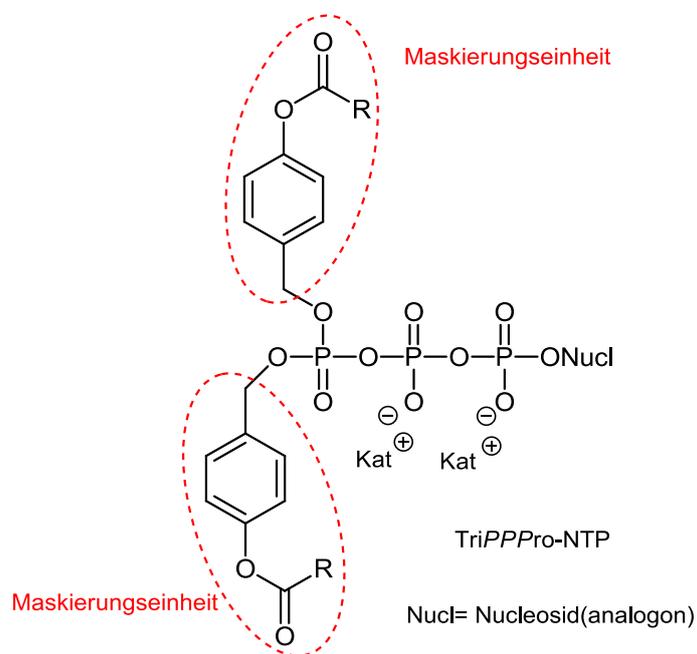


Abbildung 15: Maskierungseinheiten nach dem TriPPPro-Konzept.^[72,73,74,75]

Dieses Konzept ermöglicht die gewünschte enzymatische Spaltung der Maskierungsgruppen des TriPPPro-NTPs, indem Esterasen oder Lipasen den Benzylester spalten (Abbildung 16). Dadurch findet eine Umpolung vom Elektronenakzeptor (Acylester) zum Elektronendonator (Phenolat) statt. Resultierend aus dieser Umpolung erfolgt eine spontane 1,6-Eliminierung, die durch eine nachfolgende Hydrolyse zur Bildung eines 4-Hydroxybenzylalkohols führt. In Analogie dazu wird auch die zweite Acyloxybenzyl-Maske abgespalten und das gewünschte NTP freigesetzt (Abbildung 16).^[72,73]

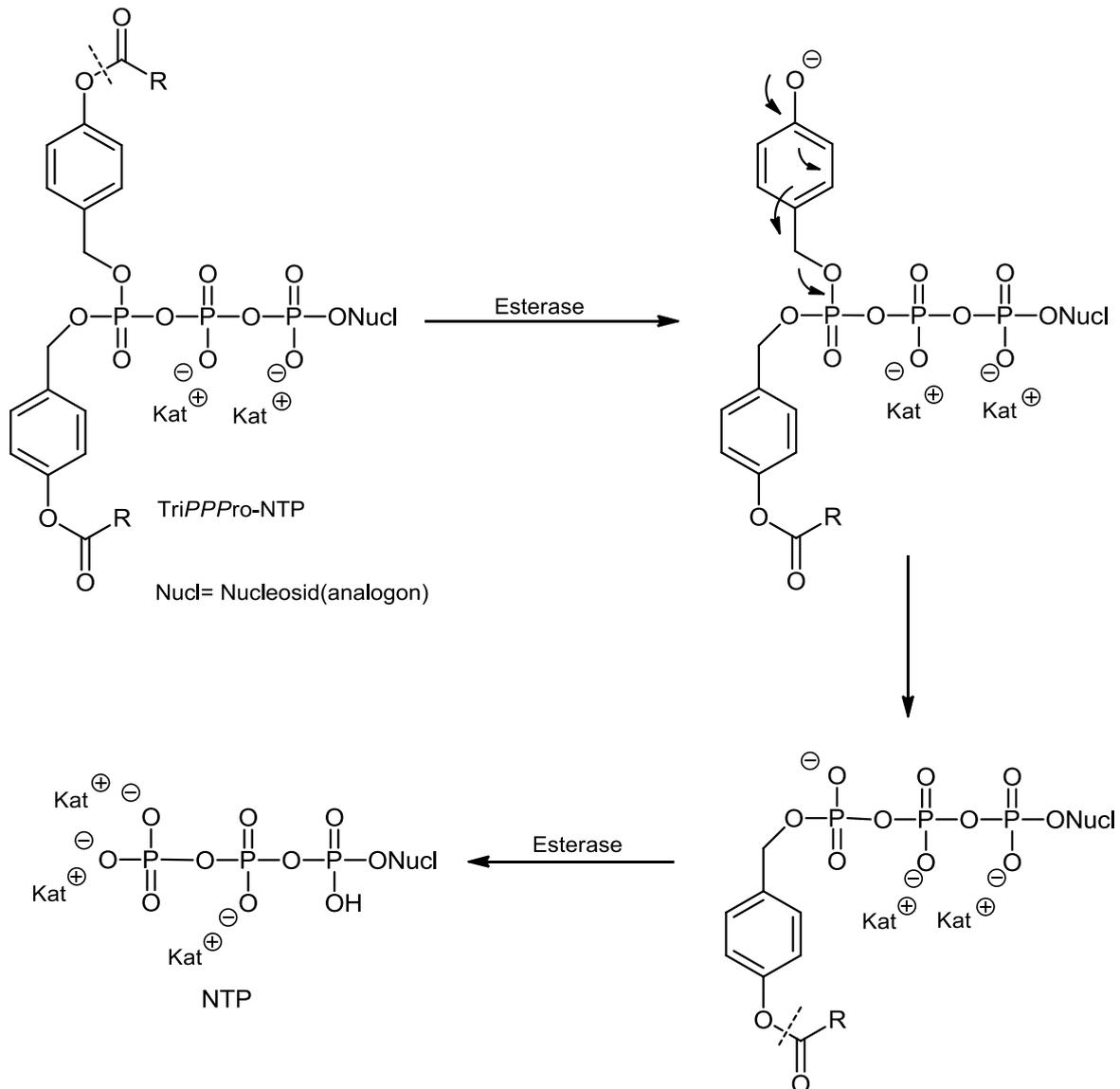


Abbildung 16: Freisetzungsmechanismus von einem NTP aus einem TriPPPro-Nucleotid.^[72,73]

Mit diesem neuartigen Konzept können erstmalig lipophil maskierte, membrangängige Triphosphat-Prodrugs dargestellt werden, die die natürliche Phosphorylierungskaskade vollständig umgehen und den aktiven Metaboliten am Zielort (intrazellulär) freisetzen (Abbildung 17).^[73]

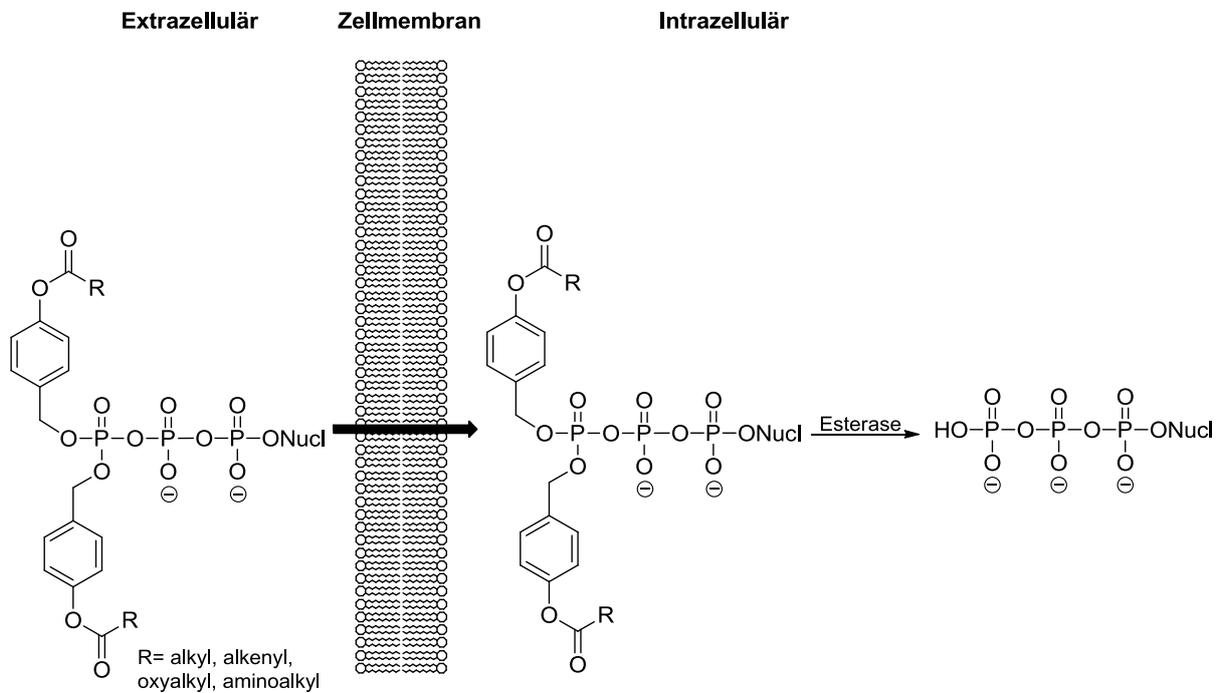


Abbildung 17: Funktionsweise eines TriPPP-ro-NTP-Prodrugs.^[73]

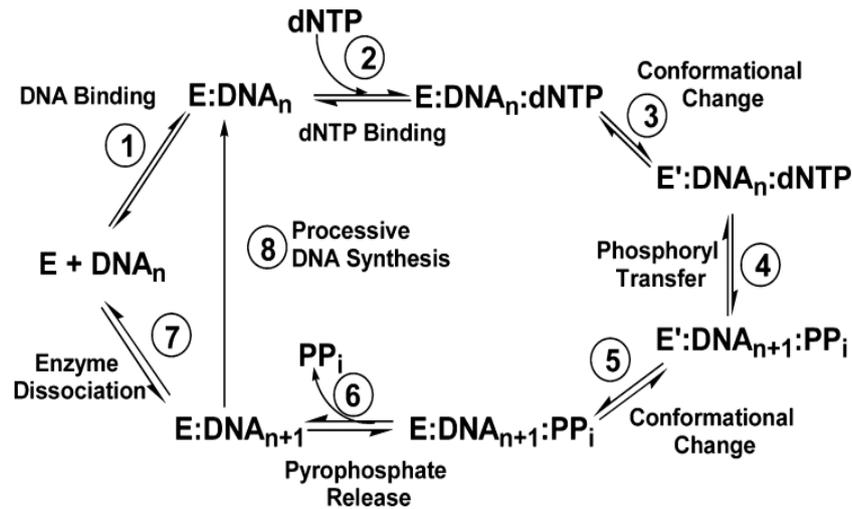
4.7 DNA-Polymerasen

Wie bereits in Kapitel 4.1 erwähnt, weisen viele Nucleosidanaloga eine antivirale Aktivität auf. Aufgrund ihrer hohen Cytotoxizität können jedoch zahlreiche dieser Verbindungen nicht als Wirkstoff eingesetzt werden.^[42] Die Toxizität resultiert unter anderem daraus, dass die Analoga nicht nur von den viralen Polymerasen, sondern auch von den wirtszelleigenen Enzymen als Substrat erkannt werden. Dieser Umstand führt dazu, dass das Substrat von den humanen Polymerasen auch in die Wirts-DNA integriert wird. Infolge des Einbaus eines unnatürlichen Nucleosids, kann es in der Konsequenz zu unerwünschten Nebenwirkungen kommen, die sich auch in den erhöhten Cytotoxizitätswerten der unnatürlichen Nucleoside widerspiegeln können.^[76]

Allerdings besitzen die humanen DNA-Polymerasen eine Korrekturlesefunktion (*proofreading function*), sodass die unnatürlichen Nucleotide wieder abgebaut werden sollten.^[77] Dennoch ist es möglich, dass diese entfernten Nucleoside oder Nucleotide im Zellsystem verbleiben und sich daraus gegebenenfalls Cytotoxizitäten ergeben.^[78] Im Idealfall stellen die Nucleosidanaloga gar keine Substrate für die zellulären Polymerasen dar und können dadurch in weiterführenden Studien auf deren therapeutische Anwendbarkeit getestet werden.

Seit der erstmaligen Isolierung und Charakterisierung der DNA Polymerase I im Jahre 1955 durch KORNBERG konnten zahlreiche DNA-Polymerasen identifiziert werden.^[79]

Als ein gemeinsames Charakteristikum fast aller DNA-Polymerasen wurde die hochkonservierte Domäne des katalytischen Zentrums identifiziert.^[80,81] Deren Aufbau wird mit einer rechten Hand verglichen, bei der Finger, Handfläche und Daumen die verschiedenen Domänen bilden.^[82-83] Mechanistisch wird die Verlängerung des DNA-Stranges in der Replikation über das *induced fit* Model beschrieben.^[84] Im ersten Schritt bindet die Daumen-Domäne den Templatstrang an das Enzym (Abbildung 18, Schritt 1). Anschließend sorgt die Finger-Domäne für die Substraterkennung und die entsprechende Wechselwirkung mit dem Templatstrang. Nach Koordination eines entsprechenden triphosphorylierten Nucleosids (Substrat) erfolgt eine erste Konformationsänderung (Schritt 3). Diese Konformationsänderung bewirkt, dass eine räumliche Nähe zwischen der 3'-Hydroxylgruppe des terminalen Nucleotids im Primerstrang und der α -Phosphatgruppe des einzubauenden Nucleotids entsteht. Eine sich anschließende Konformationsänderung erlaubt in der Handflächen-Domäne einen nucleophilen Angriff der endständigen 3'-Hydroxylgruppe des Nucleotids im Primerstrang auf das α -Phosphat des einzubauenden Nucleotids, sodass Pyrophosphat abgespalten wird (Schritt 5 und 6). In der Daumen-Domäne kann die Polymerase nun entweder den Zyklus wiederholen oder nach Vervollständigung des Templatstrangs dissoziieren.^[84,85]

Abbildung 18: Mechanistischer Verlauf einer DNA-Synthese.^[84]

Neben einer unterschiedlichen Prozessivität der Polymerasen, die in einer durchschnittlichen Fehlerrate von 10^{-5} bis 10^{-4} Mutationen pro vervielfältigtes Basenpaar liegt, können DNA-Polymerase diverse Funktionalitäten aufweisen.^[86,87] So zeichnen sich DNA-abhängige DNA-Polymerasen, wie bereits erwähnt, durch eine *proofreading function* aus.^[77] Durch diese Funktion soll gewährleistet werden, dass während der Transkription die Zahl an Ablesefehler von der DNA-Matrize minimiert wird. Mittels der sogenannten Exonuclease-Funktion wird die Hydrolyse bzw. der Ausbau fehlerhaft inserierter Nucleotide katalysiert. Abhängig von der Richtung des Terminus handelt es sich um eine 3'-5'- oder 5'-3'- Exonuclease-Aktivität. Erfolgt die Hydrolyse eines nicht kanonischen Nucleotids innerhalb eines bereits synthetisierten DNA-Strangs, wird dies als 5'-3'-Endonuclease-Aktivität bezeichnet.^[87,88]

Die Einordnung der DNA-Polymerasen in die entsprechenden Klassen wird durch deren Sequenz- und Strukturhomologie bestimmt. Anhand dessen erfolgt die Klassifizierung der DNA-Polymerasen von zellulären Lebewesen in sieben Familien (A, B, C, D, X, Y und RT).^[89,90] Aus diesen Familien sind bislang 16 humane DNA-Polymerasen bekannt. Die Hauptfunktion der humanen DNA-Polymerasen α , δ , ϵ (Familie B) und γ (Familie A) ist die Replikation der genomischen DNA. Einen besonderen Stellenwert im Zusammenhang mit dem therapeutischen Einsatz von nucleosidischen Arzneimitteln hat die humane DNA-Polymerase γ , die in den Mitochondrien (umgangssprachlich „Kraftwerk der Zellen“) die Replikation der mitochondrialen DNA katalysiert.^[90] Große Bedeutung hat auch die humane DNA-Polymerase β (Familie X), die für die Behebung von Einbaufehlern verantwortlich ist, die während der DNA-Synthese auftreten.^[90]

In der Familie RT finden sich neben den eukaryotischen Telomerasen auch die Reversen Transkriptasen der entsprechenden Retroviren wieder. Ein bekannter Vertreter ist hierbei die HIV-Reverse Transkriptase, die für die Transkription des viralen RNA-Genoms in die entsprechende virale DNA zuständig ist, welche im späteren Verlauf in die Wirts-DNA eingebaut wird und auf diese Weise die Infektion der Zelle erst ermöglicht.^[91,92]

Die vorgestellte Thematik unterstreicht das chemisch-pharmazeutische Potential von Nucleos(t)idanaloga im Zusammenspiel mit Enzymen. Damit diese Substanzen in der Therapie eingesetzt werden können, müssen gleichzeitig ihre Aktivität erhöht und ihre Toxizität minimiert werden. Um so eine Optimierung der potentiellen Wirkstoffe vornehmen zu können, sollte jedoch ihr Metabolisierungsverhalten sowie ihr Wirkmechanismus bestmöglich verstanden werden. Erstrebenswert ist es daher, durch die Aufklärung der zellulären biochemischen Prozesse, die durch die Wirkstoffe induziert werden, einen elementaren Beitrag zur Verbesserung von nucleosidischen Therapeutika zu leisten.

5. Aufgabenstellung

In der antimikrobiellen Chemotherapie werden derzeit erfolgreich strukturelle Analoga natürlicher Nucleoside (DNA- bzw. RNA-Baustein) eingesetzt. In den letzten Jahrzehnten hat sich, insbesondere bei der HIV-Therapie, vor allem die Gruppe der NRTI hervorgetan. Zu dieser gehört auch die Klasse der carbocyclischen Nucleosidanaloga. In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf einem dieser Nucleosidanaloga – dem carbocyclischen D-*carba*-dT **16**. Dieses Analogon **16** weist trotz der vorhandenen 3'-Hydroxylgruppe und seiner starken strukturellen Ähnlichkeit zu dem natürlichen Baustein Thymidin **22** eine sehr gute antivirale Aktivität auf. In auf vorangegangene Studien konnte festgestellt werden, dass nach dessen Einbau in den synthetisierten DNA-Strang die virale DNA-Synthese über einen *delayed chain termination* Wirkmechanismus abbricht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Beiträge zur Klärung der Funktionsweise von D-*carba*-dT **16** innerhalb dieses Wirkmechanismus geleistet werden.

Dabei galt es zunächst, das carbocyclische Analogon D-*carba*-dT **16** ausgehend von Natriumcyclopentadienid **23** in einer mehrstufigen Synthesesequenz darzustellen, um sowohl die Synthese des entsprechenden Triphosphats **24** als auch die des Phosphoramidits **25** anschließen zu können (Abbildung 19). Auf Basis dieser Moleküle sollte in biochemischen Studien die Aufklärung der Funktionsweise des *delayed chain termination* Wirkmechanismus erfolgen.

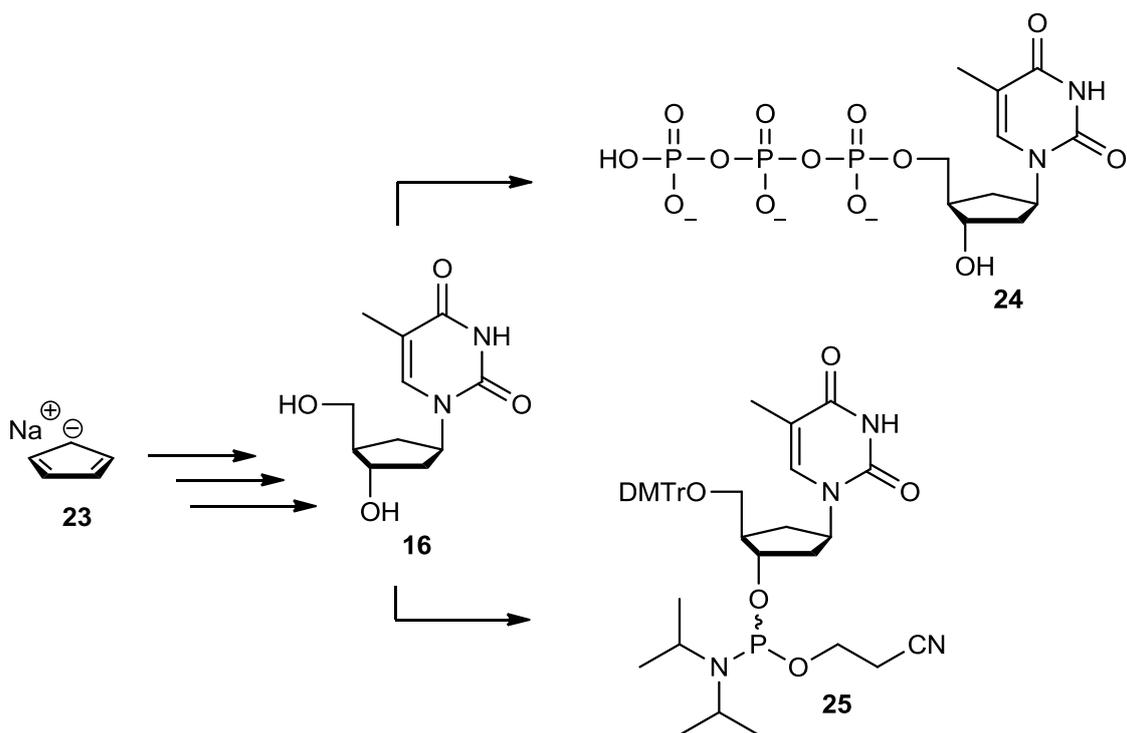


Abbildung 19: Darstellung des Phosphoramidits **25** und des Triphosphats **24** ausgehend von Natriumcyclopentadienid **23**.

Des Weiteren sollte, aufbauend auf dem TriPPPro-Konzept, das zur intrazellulären Freisetzung biologisch aktiver Nucleosidtriphosphate entwickelt wurde, eine neue Generation von γ -modifizierten-Triphosphat-Prodrugs dargestellt und untersucht werden. Diese sollte neben einer erhöhten Stabilität auch eine generelle Differenzierung zwischen viralen und zellulären Polymerasen erlauben (Abbildung 20).

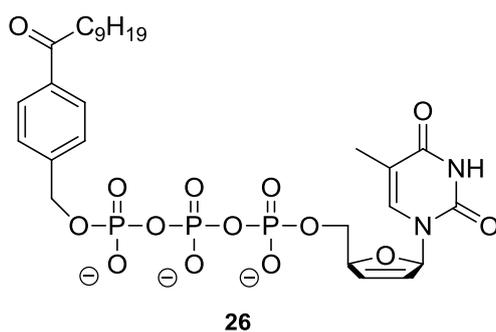


Abbildung 20: Beispiel eines γ -modifizierten-Triphosphats **26**.

Ein weiteres Ziel war die stereoselektive Synthese von carbocyclischen L-2'-Fluor-, „*up*“-Nucleosiden. Derartige nucleosidische Analoga könnten potentiell in Zukunft als neue HBV Wirkstoffe Einsatz finden, weshalb ein effektiver synthetischer Zugang notwendig ist. Dabei stand vor allem die Darstellung des Thymidinderivates **27** im Fokus.

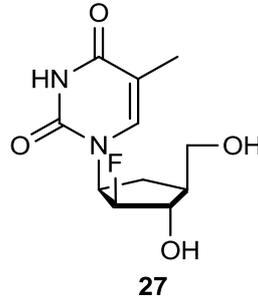


Abbildung 21: L-carba-2'-Fluor-, „*up*“-Thymidin **27**.

6. Resultate und Diskussion

6.1 Darstellung und molekularbiologische Untersuchungen des carbocyclischen Nucleosids D-carba-dT 16

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden, aufbauend auf den Ergebnissen von BOYER, Studien zur Aufklärung der Funktionsweise von D-carba-dT 16 durchgeführt.^[53] Im Folgenden wird zunächst die Synthese der carbocyclischen Verbindungen D-carba-dT-Triphosphat (D-carba-dTTP) 24 und des Phosphoramidits 25 beschrieben, die den molekularbiologischen Untersuchungen als Grundlage dienten. Wie bereits in Abschnitt 4.3 erläutert, handelt es sich bei D-carba-dT 16 um ein Nucleosidanalogen, das eine hohe antivirale Aktivität aufweist.^[55] Bei den klassischen NRTI resultiert die antivirale Aktivität aus der im Vergleich zu den natürlichen Nucleosiden fehlenden 3'-Hydroxylfunktion, wodurch nach erfolgtem Einbau des NRTIs in den wachsenden Strang die weitere DNA-Elongation nicht mehr gelingt. Dieser Abbruchmechanismus wird als *immediate chain termination* bezeichnet.^[93]

Im Gegensatz zu den klassischen NRTI weist D-carba-dT 16 jedoch eine 3'-Hydroxylfunktion auf, die den weiteren Strangaufbau in der DNA-Synthese erlaubt. Bedingt durch das Vorhandensein dieser 3'-Hydroxylgruppe, kann die antivirale Aktivität von dem carbocyclischen Nucleosids 16 nur durch den Wirkmechanismus einer verspäteten, der sogenannten *delayed chain termination*, erklärt werden, wobei die Funktionsweise des carbocyclischen Analogons 16 innerhalb dieses Wirkmechanismus bislang nicht aufgeklärt wurde.^[53]

6.1.1 Erste literaturbekannte Beiträge zur Aufklärung der Funktionsweise des Wirkmechanismus ausgehend von D-carba-dT 16

Erste Studien zur Aufklärung des Wirkmechanismus von D-carba-dT 16 erfolgten in einer früheren Kooperation zwischen SVENJA WARNECKE mit STEPHEN HUGHES, National Cancer Institute (USA).^[53] In Primer-Verlängerungs-Studien (*primer extension assays*) wurden dabei Untersuchungen mit dem biologisch aktiven Metaboliten D-carba-dTTP 24 durchgeführt, wobei das virale Enzym HIV-RT als Polymerase diente. Dazu wurde ein an der 5'-Position radioaktiv markierter Primer mit einem DNA- bzw. RNA-Templat hybridisiert und das Inhibierungsverhalten des Substrates 24 bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen untersucht.^[53]

Das erhaltene Autoradiogramm der Primer-Verlängerungs-Studie an einem DNA-Primer ist in Abbildung 22 gezeigt. Die Referenzprobe ist mit „No RT“ markiert, da hier keine Polymerase zugesetzt wurde, sodass keine Verlängerung des Stranges erfolgen konnte.

Des Weiteren wurden unterschiedliche Untersuchungen mit ddTTP, TTP oder D-carba-dTTP **24** vorgenommen, denen ergänzend jeweils dATP (A), dCTP (C) und dGTP (G) hinzugefügt wurde.

Der Reaktionsansatz „ddTTP“ zeigte aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe nach Einbau des Nucleosids (Primer+1 = n+1) einen sofortigen Kettenabbruch. Im Gegensatz dazu, wurde in der Probe „TTP“ bei Anwesenheit aller natürlichen Nucleoside erwartungsgemäß die vollständige Elongation des Stranges beobachtet. Liegt ein Gemisch aus „TTP“ und „ddTTP“ im Verhältnis 1:1 vor, war zwar auch eine vollständige Elongation des Stranges erkennbar, jedoch in deutlich abgeschwächter Form. Dies konnte auf die kompetitive Situation zwischen dem natürlichen Nucleosid Thymin und dem inhibierenden Analogon „ddTTP“ zurückgeführt werden. Wird „ddTTP“ in den wachsenden DNA-Strang integriert, fand ein sofortiger Kettenabbruch statt, weshalb auf der entsprechenden Bahn mehrere Strangabbrüche erkennbar waren.^[53]

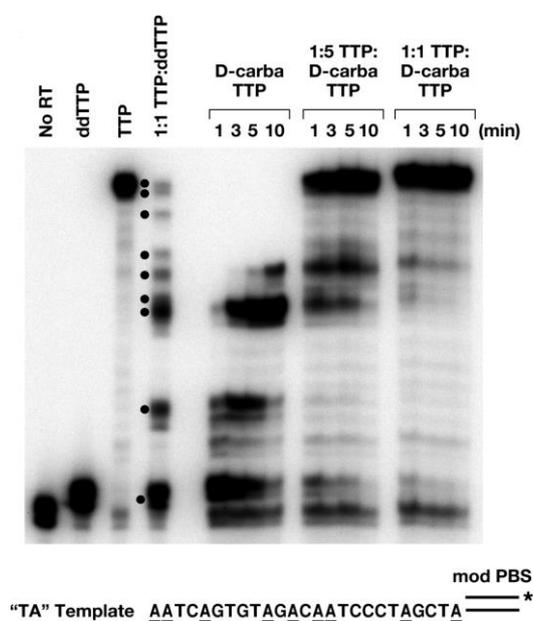


Abbildung 22: Autoradiogramm der Inhibierungsstudie von D-carba-dTTP **24** an einem DNA/DNA-Komplex (Primer/Tempelat).^[53]

Um eine Korrelation zwischen Zeit und Umfang der Integration von D-carba-dTMP **28** bzw. der Strangverlängerung zu überprüfen, wurde in weiteren *primer extension assays* zudem ein zeitaufgelöster Ansatz mit D-carba-dTTP **24** durchgeführt. Es wurde ersichtlich, dass sich D-carba-dTMP **28** nicht wie ein klassischer HIV-RT Inhibitor verhält, der nach Insertion zu einem sofortigen Kettenabbruch führt. Vielmehr fand nach einem Einbau des Analogons **28** die Insertion weiterer Nucleosidbausteine statt, wenngleich auch in erkennbar verlangsamtem Umfang.

Allerdings war keine vollständige Kettenelongation festzustellen, da nach weiteren n-Insertionen die DNA-Synthese komplett zum Erliegen kam. Daraus ergab sich, dass es sich bei dieser Inhibierungsform um einen *delayed chain termination* Mechanismus handeln müsste.

In weiteren Ansätzen galt es, die Auswirkungen unterschiedlicher Konzentrationsverhältnisse von D-*carba*-dT-Triphosphat **24** und dem natürlichen Substrat Thymidin-Triphosphat zu untersuchen. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass das natürliche TTP, verglichen mit D-*carba*-dTTP **24**, ein signifikant besseres Substrat für die Polymerase darstellte, sodass trotz eines Überschusses des Inhibitors **24** eine vollständige Elongation des DNA-Stranges erfolgen sollte. Obwohl die Mehrheit der DNA-Stränge vollständig verlängert wurde, war ebenso die Bildung von Abbruchsträngen deutlich erkennbar. Dies war darauf zurückzuführen, dass neben dem natürlichen TTP auch D-*carba*-dTTP **24** als Substrat diente.^[53]

Unter analogen Versuchsbedingungen wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, wobei anstelle eines DNA-Templats ein RNA-Templat eingesetzt wurde. In Abbildung 23 ist das erhaltene Autoradiogramm der entsprechenden *primer extension assays* gezeigt.^[53] Ersichtlich war hierbei, dass die Bildung von Abbruchsträngen in den durchgeführten, zeitaufgelösten Ansätzen im RNA-Templat ausgeprägter war, im Vergleich mit den zuvor aufgeführten Ergebnissen des DNA-Templats. Daraus kann die These formuliert werden, dass das Inhibierungspotential des D-*carba*-dT-Monophosphats **28** auf RNA-Ebene größer ist, als auf DNA-Ebene.

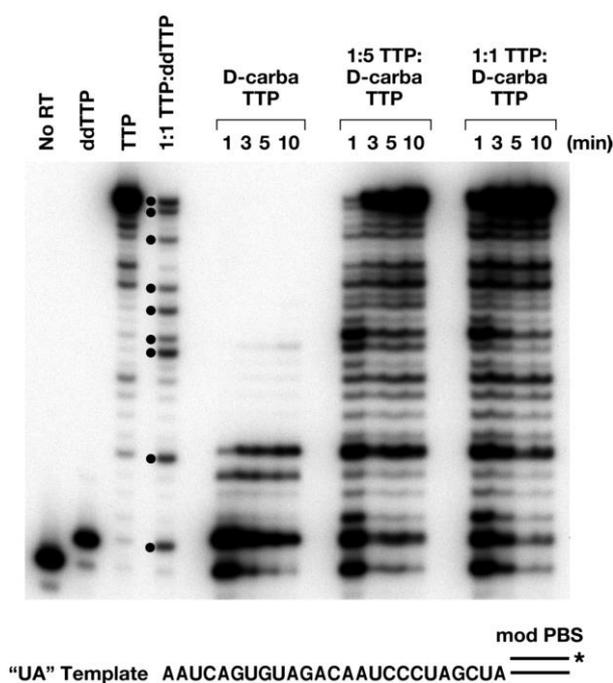


Abbildung 23: Autoradiogramm der Inhibierungsstudie von D-*carba*-dTTP **24** an einem DNA/RNA-Komplex (Primer/Templat).^[53]

In einer zusätzlichen Kooperation von SÖNKE JESSEL und ANDREAS MARX, Universität Koblenz, wurde *D-carba*-dT **16** in ein Oligonucleotid eingebaut, um dessen Einflussnahme auf die Genauigkeit des komplementären Nucleotideinbaus zu überprüfen.^[94]

Im Gegensatz zur Kooperation mit STEPHEN HUGHES wurde für diese Untersuchungen die humane DNA-Polymerase β verwendet, welche für die zelluläre Reparatur zuständig ist.

In Abbildung 24 ist das Autoradiogramm des unmodifizierten DNA/DNA-Komplexes dieser Untersuchung gezeigt. Der linke Spot gibt die Länge des Primers von 25 nt ($n = 25$ Nucleotide (nt)) an, da in dieser Probe keine Polymerase zugegeben wurde. Der zu verlängernden Sequenz wurde in den weiteren vier Reaktionsansätzen, wie jeweils angegeben, die natürlichen Substrate von „A“, „C“, „G“ und „T“ in ihrer Triphosphatform zugesetzt. Wie zu erwarten, ist ein zweifacher kanonischer Einbau von AMP erkennbar. In den übrigen Ansätzen mit „C“, „G“, „T“ findet erwartungsgemäß kein Einbau statt.^[94]

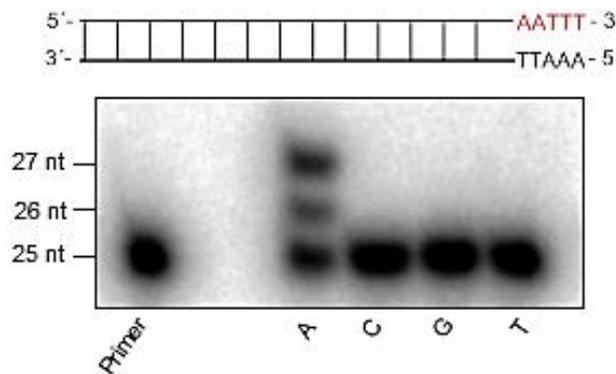


Abbildung 24: Autoradiogramm der Inhibierungsstudie an einem unmodifizierten DNA/DNA-Komplex (Primer/Templat) mit der humanen DNA-Polymerase β .^[94]

Diese Ergebnisse können mit den Resultaten des Experiments, das auf einem mit *D-carba*-dTMP **28** modifizierten Strang basiert, verglichen werden (Abbildung 25). Es handelt sich dabei um einen DNA-Strang, bei dem an Position 1 chemisch ein *D-carba*-dTMP **28** anstelle eines dTMPs eingebaut wurde.

Laut BOYER weisen *D-carba*-dT **16** und sein natürlicher Komplementärbaustein T **22** eine sehr ähnliche Struktur auf.^[53] Dies führte zu der Annahme, dass das *D-carba*-dTMP **28** im Templatstrang keine Konformationsänderung hervorruft, sodass ein zweifacher Einbau zu beobachten sein müsste.^[94]

Abbildung 25 zeigt das erhaltene Autoradiogramm dieser Untersuchung. In diesem Fall ist der Primer (n = 25 nt) auf der rechten Bahn visualisiert. Gegenüber der Untersuchung des unmodifizierten Stranges ist ein deutlicher Unterschied erkennbar: Anstelle eines zweifachen Einbaus von AMP findet nur in geringfügigem Umfang ein einfacher Einbau statt.

Eine mögliche Erklärung für die erhaltenen Ergebnisse ist, dass der Einbau des carbocyclischen Nucleotidmonophosphats **28** im Oligonucleotid entgegen der Literatur doch eine Konformationsänderung hervorruft. Diese Änderung der Konformation könnte im Weiteren dazu führen, dass das einzubauende Substrat von der Polymerase nicht als solches erkannt wird.^[94] Infolgedessen kommt es zum Abbruch der DNA-Synthese.

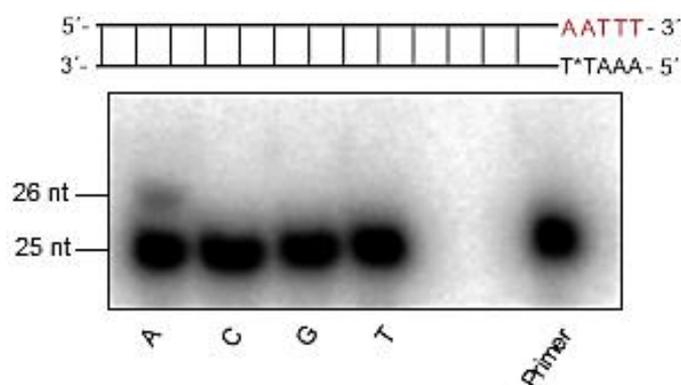


Abbildung 25: Autoradiogramm der Inhibierungsstudie an einem modifizierten DNA/DNA-Komplex (Primer/Templat) mit der humanen DNA-Polymerase β .^[94]

6.1.2 Syntheseroute zur Darstellung der Zielverbindungen *D-carba*-dT **16**, *D-carba*-dTTP **24** und des entsprechenden Phosphoramidits **25**

Um im Rahmen dieser Arbeit weitere Untersuchungen bezüglich der ungeklärten Funktionsweise des *delayed chain termination* Wirkmechanismus ausgehend von *D-carba*-dTMP **28** vornehmen zu können, war zunächst die Darstellung des carbocyclischen Nucleosidsanalogons **16** über eine mehrstufige Syntheseroute erforderlich (Abbildung 26). Ausgehend von *D-carba*-dT **16** sollte sich sowohl die Synthese des entsprechenden Triphosphats **24** als auch die des Phosphoramidits **25** anschließen. Letzteres bildet den Grundbaustein für Oligonucleotid-Synthesen, die für weitere molekularbiologischen Untersuchungen genutzt werden sollten.

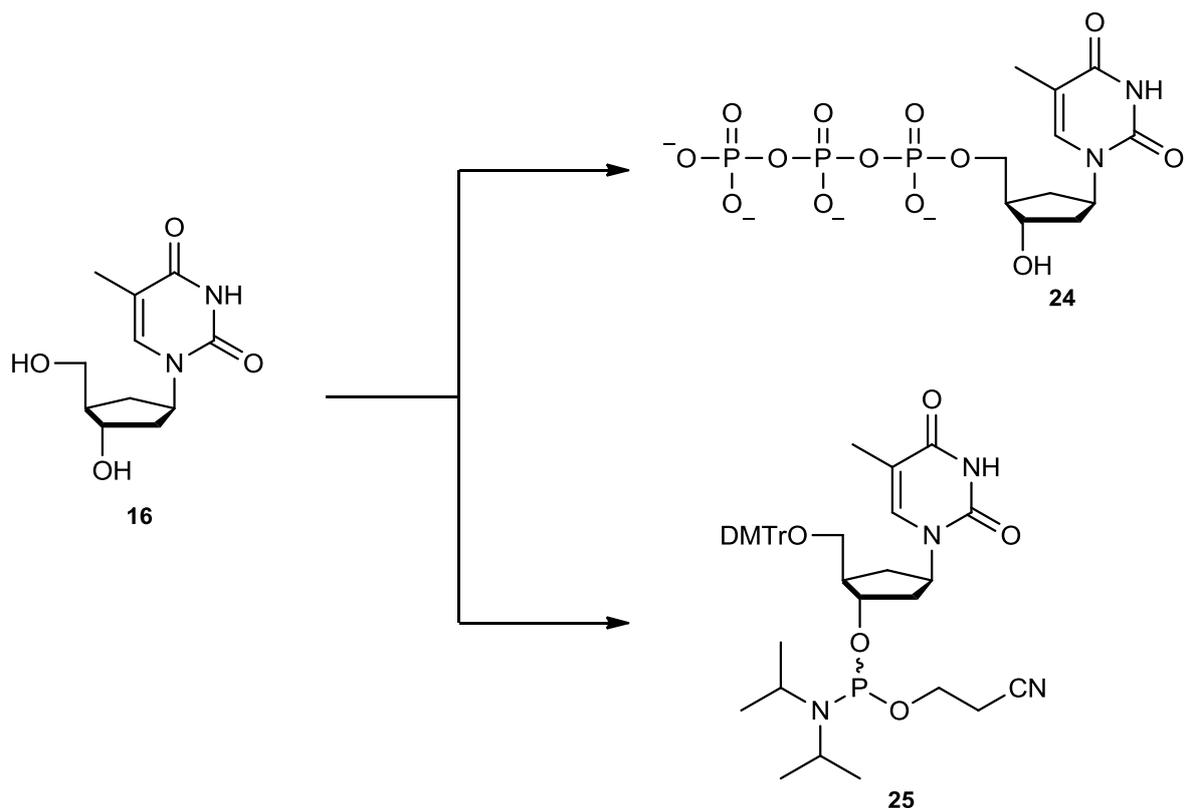


Abbildung 26: Darstellung des Triphosphats **24** und Phosphoramidits **25** als Zielverbindungen ausgehend vom Nucleosid **16**.

6.1.2.1 Darstellung von D-carba-dT **16**

Die Darstellung von D-carba-dT **16** sollte über eine konvergente Synthesestrategie erfolgen. Als Startmaterial der Synthesesequenz diente hierbei das kostengünstige Natriumcyclopentadienid **23**. Durch eine Alkylierungsreaktion mit anschließender Hydroborierung sollte zunächst das Cyclopentanol **29** generiert werden. Nach der Herstellung des Alkohols **30** sollte im weiteren Verlauf unter Mitsunobu-Bedingungen zunächst das Cyclopentanol **31** sowie das benzylgeschützte Nucleosid **32** und anschließend das gewünschte carbocyclische Nucleosid D-carba-dT **16** erhalten werden. Das entsprechende Retrosyntheseschema ist in Abbildung 27 gezeigt.

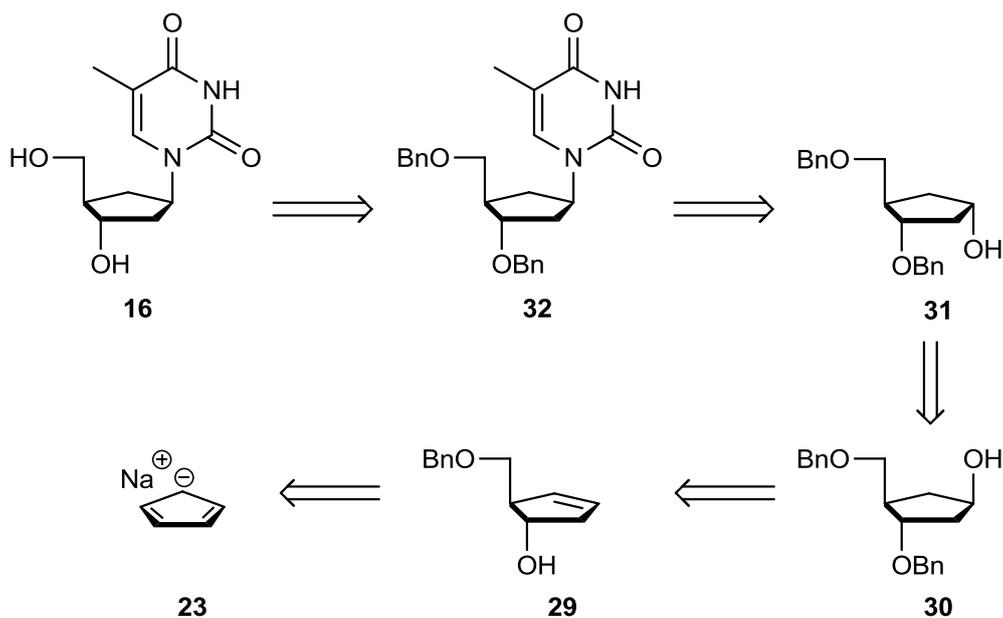


Abbildung 27: Retrosyntheseschema zur Darstellung von D-carba-dT **16** ausgehend von Natriumcyclopentadienid **23**.

Die gewählte Synthesesequenz zur Herstellung von D-carba-dT **16** beruht im ersten Schritt auf den Ergebnissen von BIGGADIKE.^[95,96] Zum Aufbau des carbocyclischen Grundgerüsts wurde als Startmaterial das kostengünstige Natriumsalz des Cyclopentadienyls **23** gewählt, welches in einer Alkylierungsreaktion zum symmetrischen Intermediat **33** umgesetzt wurde. Bei dieser literaturbekannten Prozedur erweist sich grundsätzlich die Aufarbeitung des Rohproduktes als sehr schwierig, da eine Erwärmung des Reaktionsgemisches auf Raumtemperatur zu einer Isomerisierung des Intermediats **33** führt.^[95,96] Daraus resultierend findet bevorzugt die Bildung des unerwünschten unsymmetrischen Diengemisches **34a,b** statt (Abbildung 28).

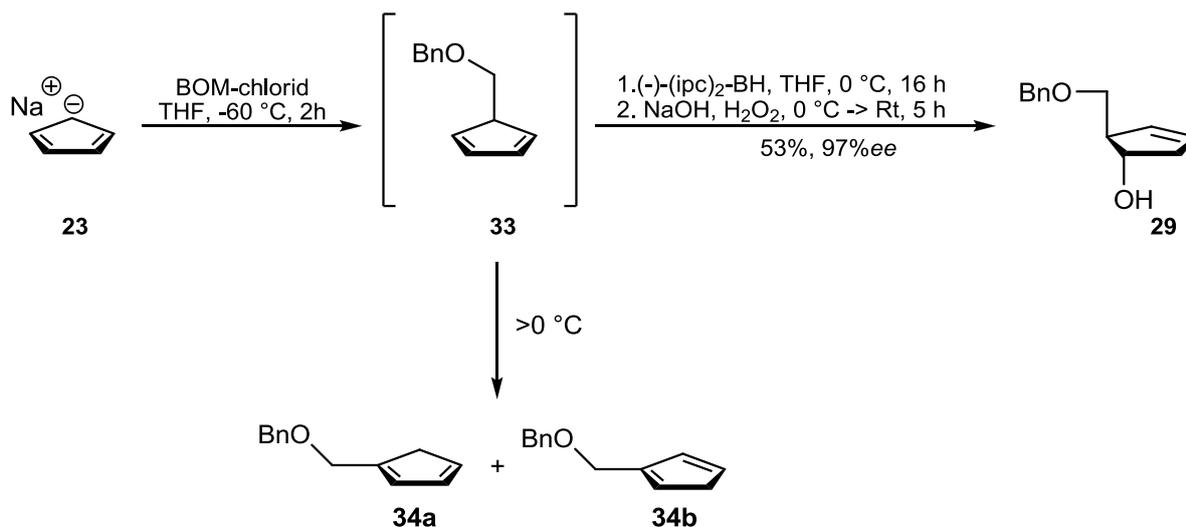


Abbildung 28: Darstellung des Cyclopentenols **29** ausgehend von Natriumcyclopentadienid **23** unter Temperaturkontrolle.

Aus diesem Grund wurden für die Synthese von dem Cyclopentenol **29** in dieser Arbeit die Erkenntnisse von SÖNKE JESSEL und SIMON WEISING genutzt, die im Vorwege die Reaktionsparameter optimiert hatten.^[94,97] Dadurch konnte die Isomerisierung zum unerwünschten Diengemisch **34a,b** durch den Verzicht einer Aufarbeitung und einer permanenten Kühlung minimiert werden (Abbildung 28).^[97] Des Weiteren wurde das Cyclopentadienintermediat **33** nach der Alkylierungsreaktion in einer *one-pot*-Reaktion durch stereoselektive Hydroborierung umgehend zum Alkohol **29** (Ausbeute 53%) umgesetzt.^[97] Durch Verwendung des Hydroborierungsreagenzes $(-)$ -Diisopinocampheylboran konnte das Cyclopentenolderivat **29** in einem hohen Enantiomerenüberschuss von 97%ee erhalten werden. Die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses erfolgte dabei mittels Gaschromatographie (GC) an der chiralen Heptakis-(2,3-di-O-methyl-6-O-*tert*-butyldimethylsilyl)- β -cyclodextrin-Phase. In dem erhaltenen Chromatogramm wurden bei Retentionszeiten von 64.7 min für das Cyclopentenol **29** und 62.6 min für L-**29** die erwarteten Verbindungen erfolgreich detektiert (Abbildung 29). Über die Integration der Peakflächen ließ sich ein Enantiomerenüberschuss von 97%ee für das Cyclopentenol **29** ermitteln. Die exakte Zuordnung des Signals bei 64.7 min zu der Verbindung **29** erfolgte anhand einer Messung des Polarisationswinkels ($+8.7\text{ }^{\circ}$) und dem Vergleich mit literaturbekannten Ergebnissen.^[98]

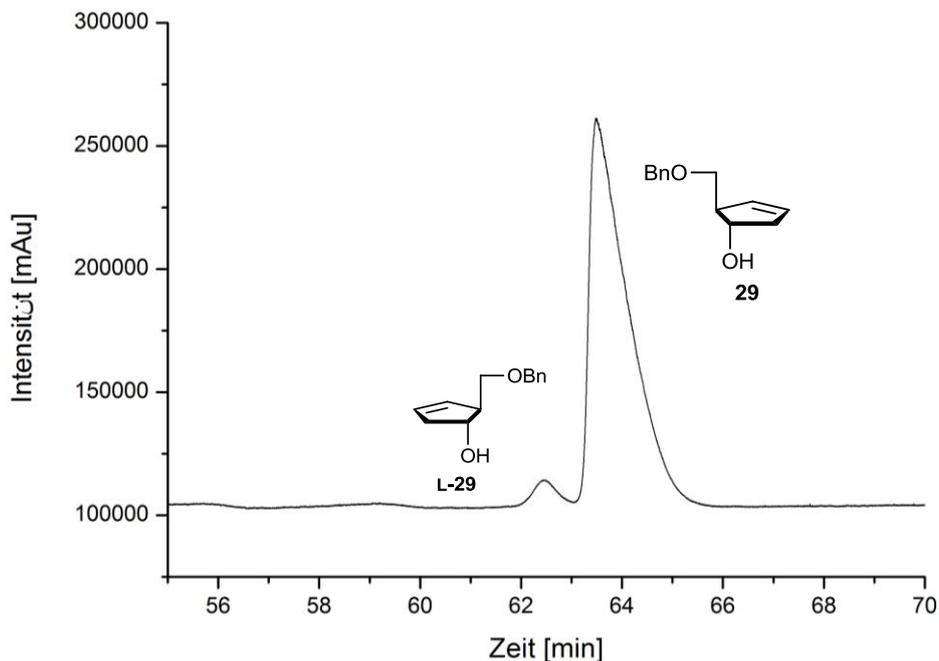


Abbildung 29: GC-Chromatogramm zur Bestimmung des Verhältnisses des Enantiomerenüberschusses der Cyclopentenole **29** und **L-29**.

Nach dem Erhalt des Cyclopentenols **29** sollte unter Anwendung einer orthogonalen Schutzgruppenstrategie die Blockierung der 2-Hydroxylgruppe erfolgen.

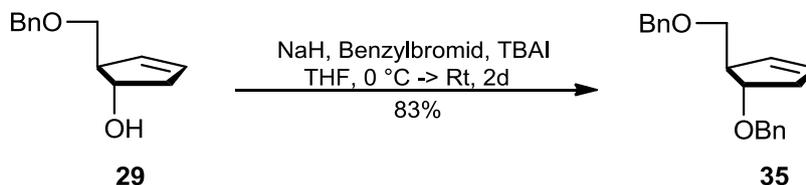


Abbildung 30: Blockierung der freien Hydroxylfunktion des Cyclopentenolderivats **29** mit einer Benzylschutzgruppe.

Die Benzylschützung erfolgte durch Umsetzung des Eduktes **29** mit Natriumhydrid, Benzylbromid und Tetrabutylammoniumiodid (TBAI) bei 0 °C. Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur und dem Rühren für zwei Tage wurde die Reaktion durch Hydrolyse mit Eiswasser beendet. Mittels Extraktion und anschließender säulenchromatographischer Reinigung konnte die benzylgeschützte Verbindung **35** in einer Ausbeute von 83% isoliert werden.

Die anschließende selektive Einführung einer weiteren Hydroxylfunktion erfolgte mittels einer Hydroborierungsreaktion unter Verwendung von 9-BBN als Hydroborierungsreagenz mit anschließender alkalischer Oxidation. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das gewünschte Cyclopentanol **30** in einer Ausbeute von 69% erhalten werden.

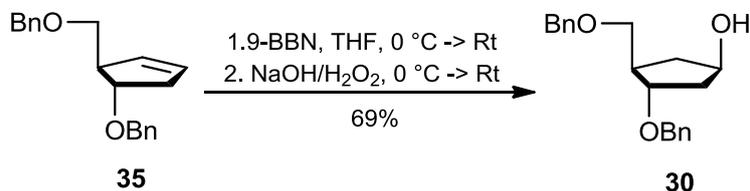


Abbildung 31: Selektive Hydroborierung des Cyclopentens **35** zum Cyclopentanol **30** durch das Reagenz 9-BBN.

Zur Darstellung des angestrebten carbocyclischen Nucleosids *D-carba*-dT **16** musste zudem eine Inversion der eingeführten Hydroxylfunktion unter Mitsunobu-Bedingungen an der C-1-Position vorgenommen werden. Dieses konnte mit einer Ausbeute von 82% realisiert werden.

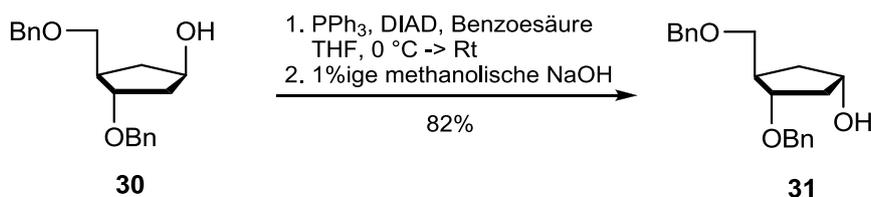
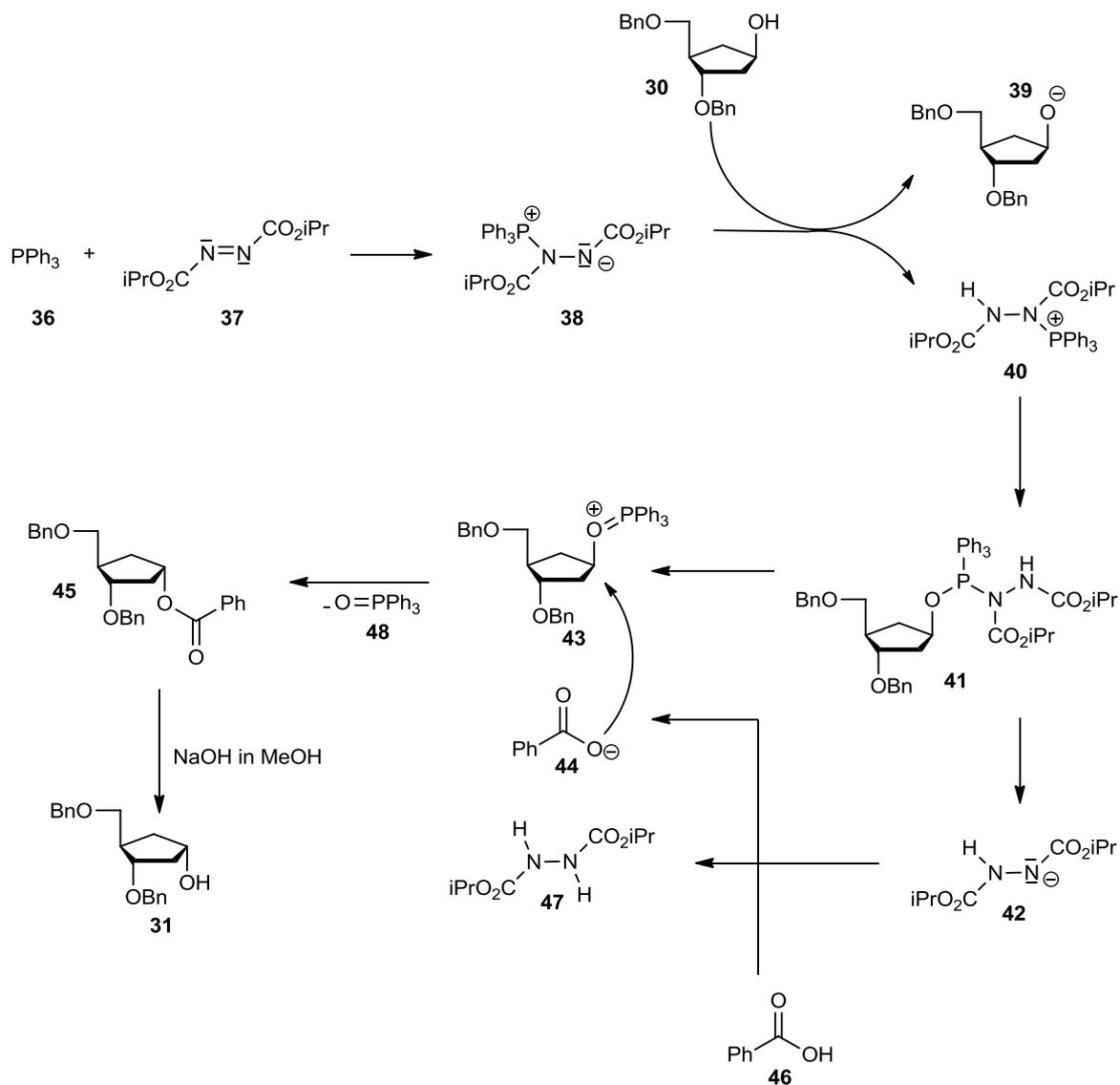
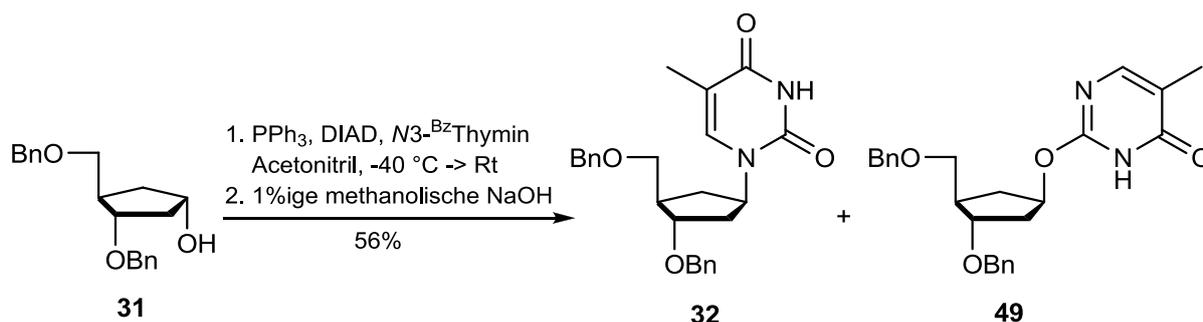


Abbildung 32: Mitsunobu-Inversion der Hydroxylfunktion des Cyclopentanol **30**.

Der Mechanismus dieser Mitsunobu-Reaktion lässt sich hierbei wie folgt beschreiben: Zunächst reagieren Triphenylphosphin **36** und Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) **37** zu dem zwitter-ionischen Addukt **38**. Das gebildete Addukt **38** bewirkt daraufhin aufgrund seiner Basizität eine Deprotonierung des Alkohols **30**. Bedingt durch einen nucleophilen Angriff des erhaltenen Alkoholats **39** an der Verbindung **40** kommt es zur Bildung des Derivats **41**. Unter Abspaltung eines Hydrazinderivates **42** erfolgt die Formierung des Oxophosphoniumsalzes **43**. Die Inversion der Konfiguration wird schließlich durch eine nucleophile Substitution nach dem S_N2-Mechanismus erreicht, indem das negativ geladene Sauerstoffatom des Benzoats **44** nucleophil am C-1-Atom des Oxophosphoniumsalzes **43** angreift. Nach alkalischer Hydrolyse des Moleküls **45** wird der invertierte Alkohol **31** erhalten.^[99]

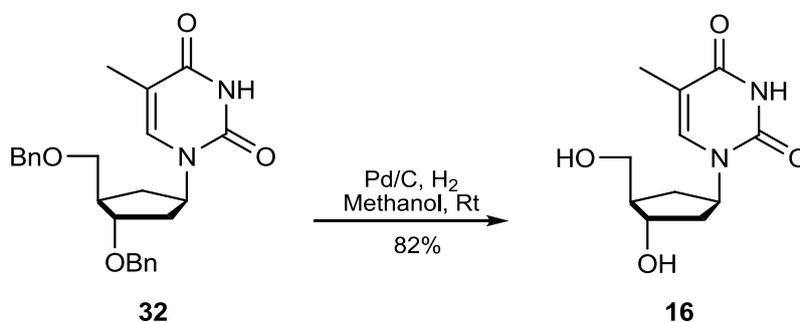

 Abbildung 33: Mechanismus der Mitsunobu-Inversion.^[99]

Im Anschluss erfolgte die Darstellung des benzylgeschützten Nucleosids **32** mit Hilfe der ebenfalls literaturbekannten Mitsunobu-Kupplung. Der Mechanismus folgt der Mitsunobu-Inversion, weshalb zur Synthese der Vorstufe ähnliche Synthesebedingungen gewählt wurden (Abbildung 34).


 Abbildung 34: Mitsunobu-Kupplung zum geschützten Nucleosid **32**.

Dabei ist entsprechend der Literatur zu berücksichtigen, dass in der Synthese zum benzylgeschützten *D-carba*-dT **32** durch Umsetzung der N³-benzoylgeschützten Pyrimidinbase Thymin das Nucleosid **32** in Acetonitril im Vergleich zum O²-gekuppelten Nucleosid **49** präferiert wird.^[100] Das N¹/O²-Produktverhältnis von 5:1 wurde aus dem Rohgemisch vor der Benzoylabsplattung aus dem ¹H-NMR-Spektrum ermittelt. Trotz mehrfacher chromatographischer Reinigung wurde das Nucleosid **32** in einer guten Ausbeute von 56% erhalten.

Die hydrogenolytische Spaltung der Benzylgruppen mittels Palladium auf Aktivkohle wurde unter Standardbedingungen vollzogen und lieferte das Zielprodukt *D-carba*-dT **16** in einer Ausbeute von 82%.


 Abbildung 35: Darstellung des carbocyclischen Nucleosids *D-carba*-dT **16**.

6.1.2.2 Darstellung des Phosphoramidits **25** und des Triphosphats **24**

Der erfolgreichen Synthese des nucleosidischen Grundbausteins *D-carba*-dT **16** schloss sich die Darstellung des entsprechenden Phosphoramidits **25** sowie des Triphosphats **24** an, um mit diesen in der Folge biochemische Untersuchungen durchführen zu können.

6.1.2.2.1 Darstellung des Nucleosid-5'-triphosphats **24**

Durch Umsetzung von *cycloSal*-Nucleotiden mit einem geeigneten Pyrophosphatsalz konnten in der Vergangenheit bereits eine Vielzahl von Nucleosid-5'-triphosphaten synthetisiert werden.^[101] In Abhängigkeit von den einzusetzenden Nucleosiden ist es möglich, die Darstellung der entsprechenden Triester über eine Phosphor(III)- oder eine Phosphor(V)-Route zu realisieren (Abbildung 36). Wird die Syntheseroute über die reaktivere Phosphor(III)-Spezies präferiert, müssen zunächst freie nucleophile Funktionen, wie z.B. die 3'-Hydroxylgruppe, geschützt werden, um eine Mehrfach-Phosphorylierung zu vermeiden. Im Gegensatz dazu, kann bei der Verwendung der weniger elektrophilen und daher unreaktiveren Phosphor(V)-Spezies auf eine Blockierung der Hydroxylfunktionen verzichtet werden.^[101]

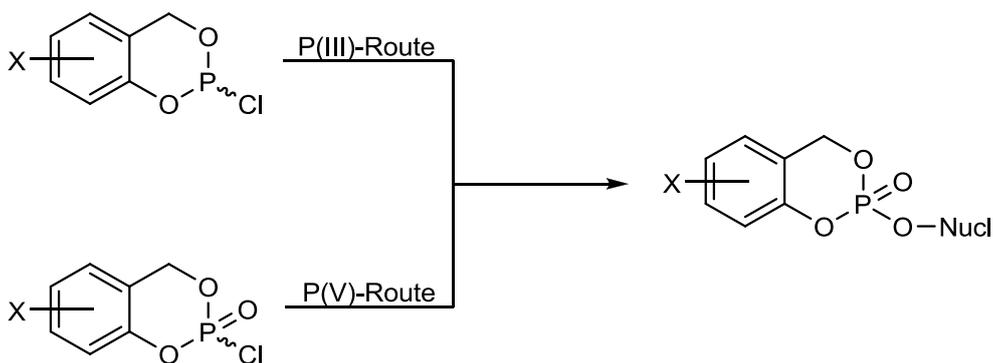
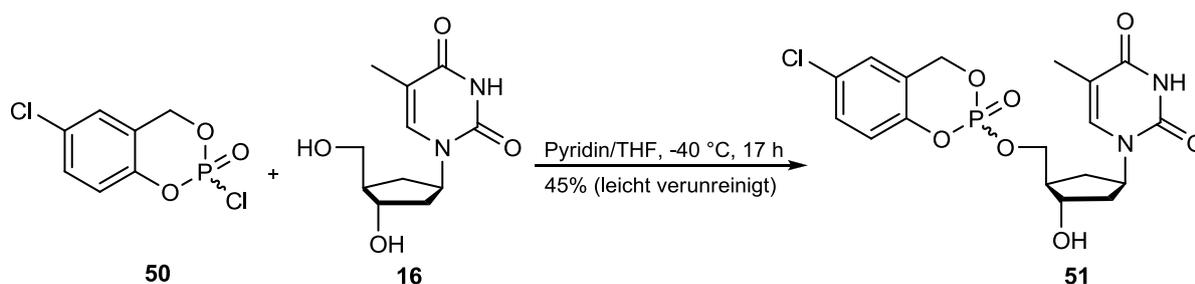


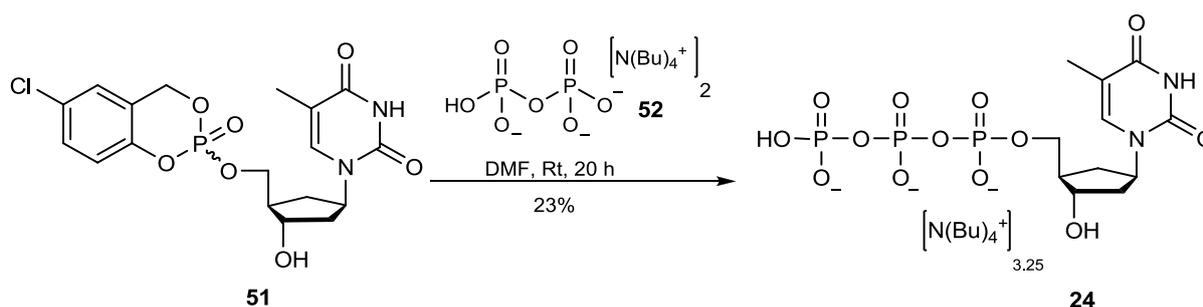
Abbildung 36: Routen zur Darstellung von *cycloSal*-Nucleotiden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die P(V)-Route vorgezogen, um auf eine orthogonale Schutzgruppenstrategie verzichten zu können. Zur Darstellung des *cycloSal*-Triesters **45** wurde das 5-Chlorsaligenylphosphorchloridat **50** verwendet, das sich in der Vergangenheit für diese Reaktionen bewährt hatte.^[101] Alternativ wäre an dieser Stelle auch eine Reaktionsdurchführung unter Verwendung von 5-NO₂-*cycloSal*-Phosphattriester denkbar.

Das eingesetzte Reagenz **50** konnte zuvor nach literaturbekannten Syntheseprotokollen in einer Ausbeute von 45% dargestellt werden.^[98,102] Für die Reaktion zum 5-Cl-Triester **51** wurde *D-carba*-dT **16** in Pyridin gelöst und bei -40 °C mit dem Chloridat **50**, gelöst in THF, versetzt. Nach chromatographischer Reinigung konnte der 5-Cl-Triester **51** leicht verunreinigt in einer Ausbeute von 45% isoliert werden.


 Abbildung 37: Darstellung des Triesters **51** über die Phosphor(V)-Route.

Zur Darstellung des Triphosphats **24** wurde im Folgenden der gebildete 5-Chlor-*cycloSal*-Phosphatriester **51** zu dem im Überschuss vorliegenden nucleophilen Pyrophosphatsalz **52** getropft. Nach dem vollständigen Umsatz des Triesters **51** wurde die Reaktion durch Coevaporation der flüchtigen Bestandteile beendet. Durch mehrfache Reinigung an RP-18-Silicagel wurde D-*carba*-dTTP **24** in einer Ausbeute von 23% erhalten. Dabei ist die niedrige Ausbeute auf nicht berücksichtigte Mischfraktionen des Nucleotids **24** mit dem schwer abzutrennenden Nucleophil zurückzuführen.


 Abbildung 38: Synthese des D-*carba*-dT-Triphosphats **24**.

Das dazugehörige ^{31}P -NMR-Spektrum ist in Abbildung 39 gezeigt. Zusätzlich zu den charakteristischen Triphosphat-Signalen sind keine weiteren Signale von möglichen phosphathaltigen Verunreinigungen zu erkennen. Das ^1H -NMR bestätigte ergänzend die hohe Reinheit der Verbindung.

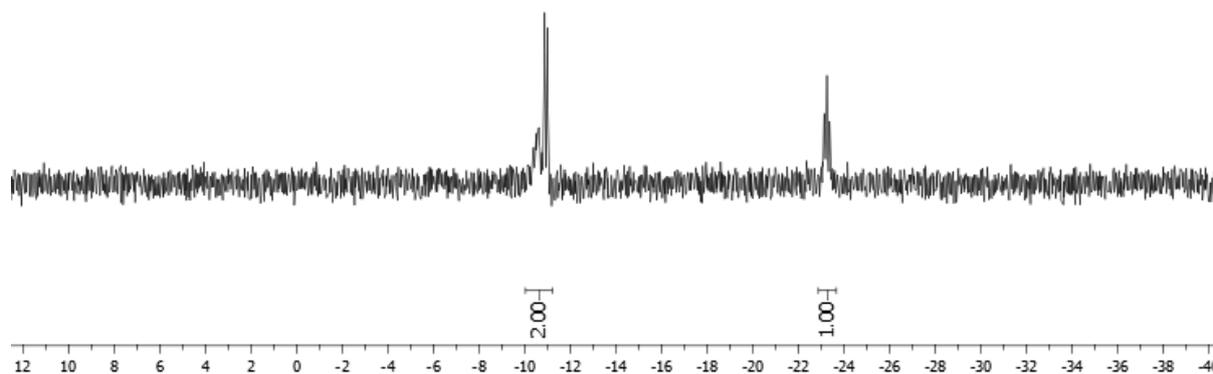


Abbildung 39: ^{31}P -NMR-Spektrum von *D-carba*-dT-Triphosphat **24**.

6.1.2.2.2 Darstellung des carbocyclischen Phosphoramidits **25**

Um das Nucleosid **25** für die Festphasensynthese der DNA-Oligonucleotide **53**, **54** und **55** nutzen zu können, musste zunächst das Phosphoramidit **25** dargestellt werden (Abbildung 40). Das Phosphoramidit **25** sollte nach Blockierung der 5'-Hydroxylgruppe ausgehend von *D-carba*-dT **16** generiert werden. Das entsprechende Retrosyntheschema ist in Abbildung 40 gezeigt.

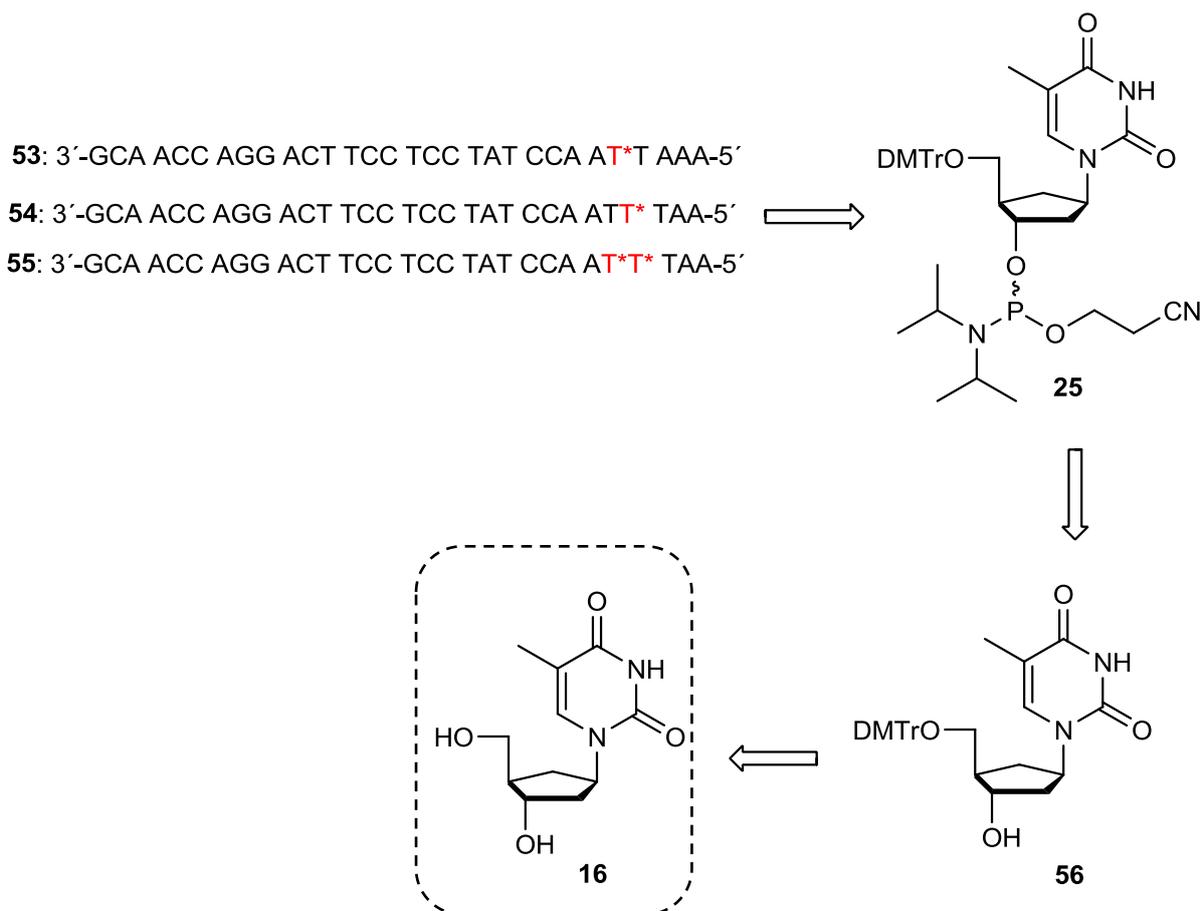


Abbildung 40: Retrosyntheseplan zur Darstellung der modifizierten Oligonucleotide **53**, **54** und **55**.

Die Einführung der säurelabilen Schutzgruppe Dimethoxytriphenylmethylchlorid erfolgte regioselektiv an der 5'-Hydroxylfunktion des carbocyclischen Nucleosids **16**. Bei der chromatographischen Reinigung wurde dem Eluentengemisch 0.1% Triethylamin hinzugefügt, um eine Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppe (DMTr) durch das schwach saure Silicagel zu vermeiden. Auf diese Weise konnte das Produkt **56** leicht verunreinigt in einer Ausbeute von 64% isoliert werden.

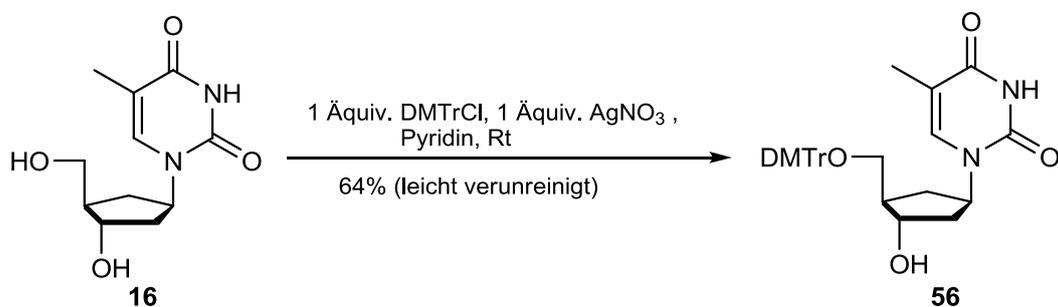


Abbildung 41: Blockierung der 5'-Hydroxylfunktion von D-carba-dT **16** mit einer Tritylschutzgruppe.

Nach der Blockierung der Hydroxylfunktion wurde durch Kupplung mit 2-O-Cyanoethyl-*N,N,N',N'*-tetraisopropylphosphordiamidit **57**, unter Zugabe von 4,5-Dicyanoimidazol (DCI) als Aktivator das gewünschte Phosphoramidit **25** erhalten. Im Gegensatz zu SÖNKE JESSEL wurde auf eine Reinigung über ALOX „neutral“ verzichtet.^[94] Stattdessen erfolgte eine chromatographische Reinigung an Kieselgel, wobei dem Eluentengemisch 2% Triethylamin hinzugefügt wurde. Durch Veränderung des Reinigungsprotokolls konnte das Produkt mit 91% in einer deutlich höheren Ausbeute isoliert und gleichzeitig der Aufwand der anspruchsvollen Reinigung verringert werden.

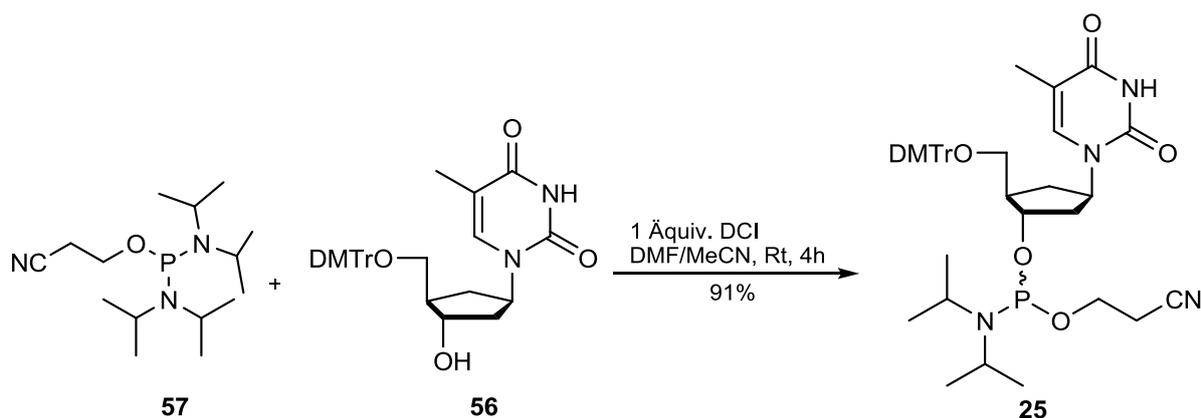


Abbildung 42: Synthese des gewünschten Phosphoramidits **25**.

Die erfolgreiche Synthese des Phosphoramidits **25** ermöglichte nun die Darstellung modifizierter DNA-Oligonucleotide am DNA/RNA-Synthesizer. Genutzt wurde hierfür die etablierte Methode von KÖSTER, welche basenlabile β -Cyanoethyl-Schutzgruppen verwendet.^[103]

In Abbildung 43 ist der allgemeine Synthesecyclus der automatisierten Oligonucleotidsynthese zusammengefasst. Generell wird dabei von dem vollgeschützten Nucleosid ausgegangen, das an einer Festphase gebunden ist, welche meist aus *controlled pore glass* (CPG) oder divinylbenzol-quervernetztem Polystyrol besteht.

Jeder Synthesedurchlauf beginnt mit der Abspaltung der DMTr-Gruppe des Nucleosids **58** mit Di- oder Trichloressigsäure. Im Kupplungsschritt muss das β -cyanoethylgeschützte Phosphoramidit **59** zunächst durch 4,5-Dicyanoimidazol oder 1-*H*-Tetrazol aktiviert werden, bevor es mit der nun freien 5'-Hydroxylfunktion des Nucleosids **60** reagieren kann. Die Oxidation des Phosphittriesters **61** zum Phosphattriesters **62** erfolgt zumeist durch Zugabe einer wässrigen Iodlösung. Um im weiteren Verlauf keine Fehlsequenzen zu generieren, müssen nicht reagierte 5'-OH-Gruppen mit *N*-Methylimidazol und Essigsäureanhydrid zum Abbruchstrang **63 gecapped** werden.

Auf diese Weise können Oligonucleotide festphasengestützt synthetisiert werden. Nach der gewünschten Zyklenzahl werden unter basischen Bedingungen die Schutzgruppen von dem Oligonucleotid entfernt und dieses im gleichen Zuge von der Festphase abgespalten, sodass das ungeschützte Oligonucleotid **64** erhalten wird.^[103]

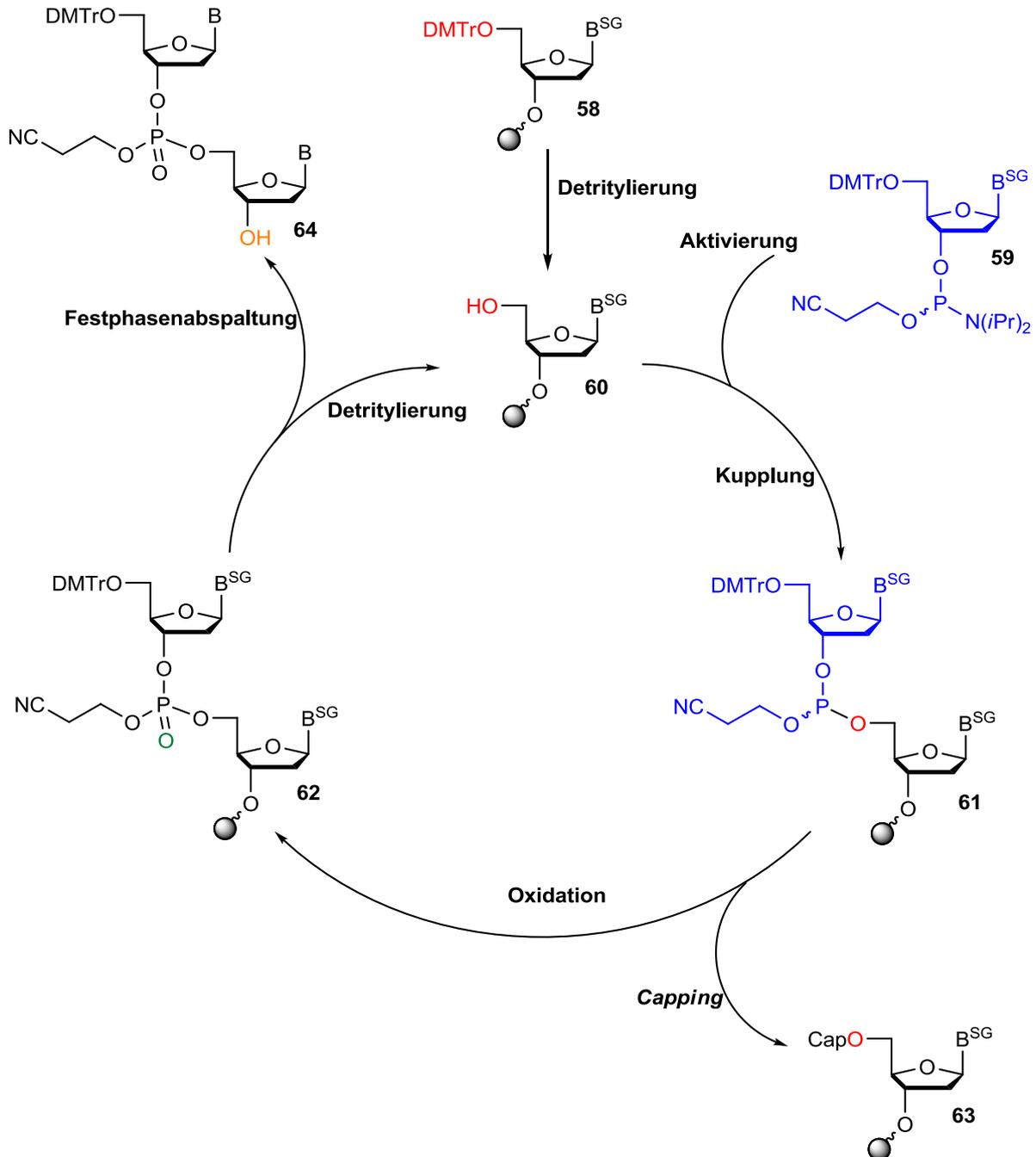


Abbildung 43: Automatisierter Synthesekreislauf zur Darstellung von Oligonucleotiden.

Die Überwachung der Kupplungsschritte erfolgte mit Hilfe eines Trityl-Assays. Grundlage dieses Assays bildet das Tritylkation, das bei der Abspaltung entsteht, photometrisch detektiert werden kann und als ein ungefähres Maß für die Kupplungsrate dient.

Das detaillierte Syntheseprotokoll zur Darstellung der modifizierten DNA-Oligonucleotide ist in Kapitel 10 aufgeführt. An dieser Stelle soll jedoch lediglich auf die Reinigung und die biochemischen Untersuchungen eingegangen werden. Im Folgenden wird die Modifikation *D-carba*-dTMP **28** in den Oligonucleotid-Strängen als T* bezeichnet.

Nach der Entschützung und der Abspaltung der Oligonucleotide von der Festphase wurden diese mittels präparativer RP18-HPLC gereinigt. Dafür wurde ein Triethylammoniumacetat (TEAA)-Puffer (pH 7.0) mit einem Acetonitril-Gradienten von 0-15% über 52 min bei Raumtemperatur verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unterschiedlich modifizierte Oligonucleotide dargestellt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Mit der Modifikation *D-carba*-dTMP **28** synthetisierte Oligonucleotide.

Oligonucleotid	Sequenz
53	3'-GCAACCAGGACTTCCTCCTATCCAAT*TAAA-5'
54	3'-GCAACCAGGACTTCCTCCTATCCAATT*TAA-5'
55	3'-GCAACCAGGACTTCCTCCTATCCAAT*T*TAA-5'

In den Abbildung 44 und Abbildung **45** sind exemplarisch sowohl das HPLC-Chromatogramm des Roh-Oligonucleotids **53** als auch vergleichend das Chromatogramm des gereinigten Oligonucleotids **53** gezeigt. Im Verlauf der Reinigung der Rohverbindung **53** wurden neben dem gewünschten Signal (31.9 min) weitere Signale festgestellt, die Abbruchsträngen zuzuordnen waren. Die Entstehung dieser Abbruchstränge spiegelte sich bereits in der photometrischen Reaktionsverfolgung der Oligonucleotidsynthese wider, die nicht auf eine quantitative Kupplungsrate hinwies (Trityl-Assay, hier nicht gezeigt).

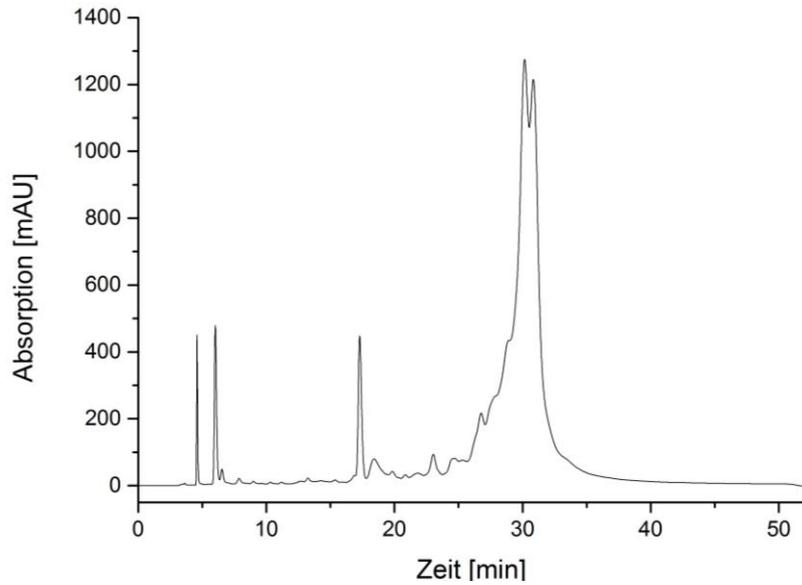


Abbildung 44: RP18-HPLC-Chromatogramm des Roh-Oligonucleotids **53**.

Nach der Isolierung der Verbindung **53** wurde das Chromatogramm des vollständig gereinigten Produkts **53** erhalten (Abbildung 45).

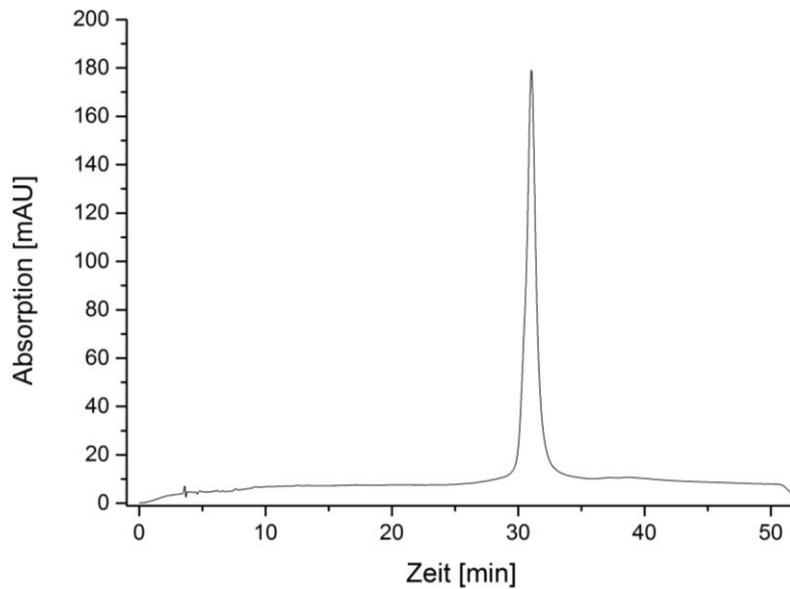


Abbildung 45: RP18-HPLC-Chromatogramm des gereinigten Oligonucleotids **53**.

Die Charakterisierung der Oligonucleotide erfolgte mittels ESI-MS oder MALDI-MS. Das in Abbildung 46 gezeigte konvolutierte ESI-MS Spektrum verdeutlicht dabei beispielhaft die entsprechenden Ladungsstufen des 30mer-Oligonucleotids **53**.

Neben den gewünschten Signalen sind im ESI-MS Spektrum keine weiteren Signale von Verunreinigungen bspw. in Form von Abbruchsträngen erkennbar. Die gewünschten Oligonucleotide **53-55** konnten in hoher Reinheit dargestellt und somit für weitere Untersuchungen eingesetzt werden.

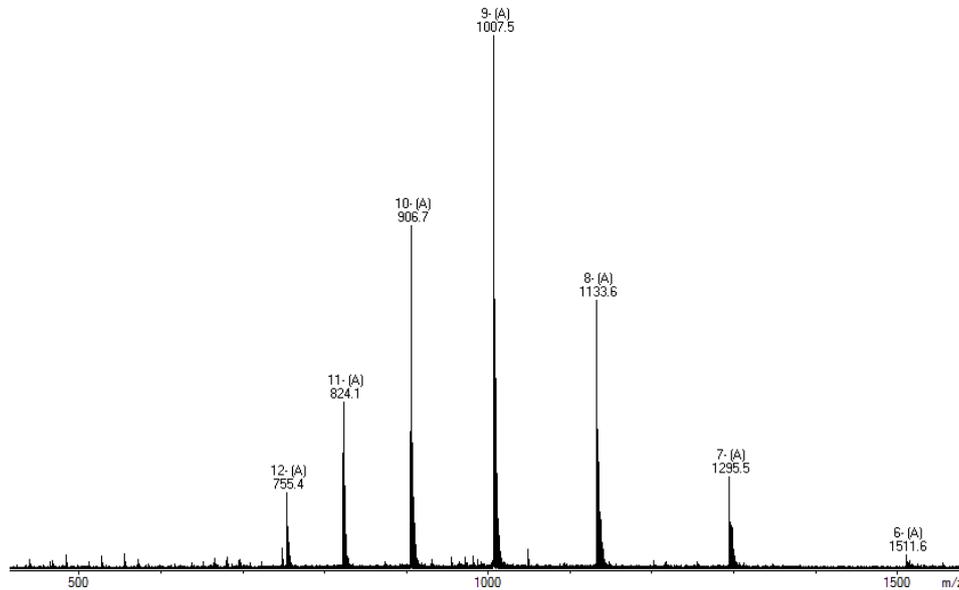


Abbildung 46: ESI-MS-Spektrum des gereinigten Oligonucleotids **53**.

6.1.3 Molekularbiologische Untersuchungen

Vorherige Studien erlaubten bereits erste Einblicke in den Wirkmechanismus von *D-carba*-dTTP **24** als Substrat. Um einen weiteren Beitrag zur Aufklärung des Wirkmechanismus zu leisten, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst der Einfluss der jeweiligen eingeführten Modifikation *D-carba*-dTMP **28** auf die Schmelztemperatur und die Konformation des Duplex-Stranges des entsprechenden Oligonucleotids untersucht. Des Weiteren wurde, angelehnt an die Experimente von BOYER, mit Hilfe des in Abschnitt 6.1.2 dargestellten carbocyclischen Analogons **24** Studien mit dem viralen Enzym HIV-RT durchgeführt.

6.1.3.1 Bestimmung der Schmelztemperaturen

Bei der Schmelztemperatur (T_M) handelt es sich um die Temperatur, bei der die Hälfte der DNA in Einzelstrang-DNA vorliegt. Durch schrittweises Erhitzen und der parallelen Messung der Absorption von ultravioletten Licht durch die DNA – hier DNA/DNA-Duplexe aus DNA-Oligonucleotiden – kann der Fortschritt der Dissoziation beobachtet werden.^[104,105] Grundlage ist, dass Systeme mit einer höheren Schmelztemperatur eine höhere Stabilität aufweisen.

Der thermisch induzierte Übergang von einem geordneten helikalen System zu einem Einzelstrang lässt sich graphisch als eine sigmoidale Kurve darstellen, wobei der Wendepunkt der Funktion dem T_M -Wert entspricht (Abbildung 47).^[104,106] Aufgrund der *base stacking interactions* bei niedrigen Temperaturen weist der DNA-Duplex einen geringen molaren Absorptionskoeffizienten auf. Bei höheren Temperaturen hingegen liegt das System als Einzelstrang vor. Dadurch können die freien π -Elektronensysteme der ungepaarten Basen stärker mit dem UV-Licht interagieren.^[104,105] Der daraus resultierende, erhöhte molare Absorptionskoeffizient wird aus der Summe aller Einzelstränge berechnet. Das bedeutet, dass mit ansteigender Temperatur und der damit verbundenen Dissoziation der DNA-Stränge eine Zunahme der UV-Absorption zu beobachten ist. Dieser Zusammenhang wird als hyperchromer Effekt bezeichnet.^[104,105]

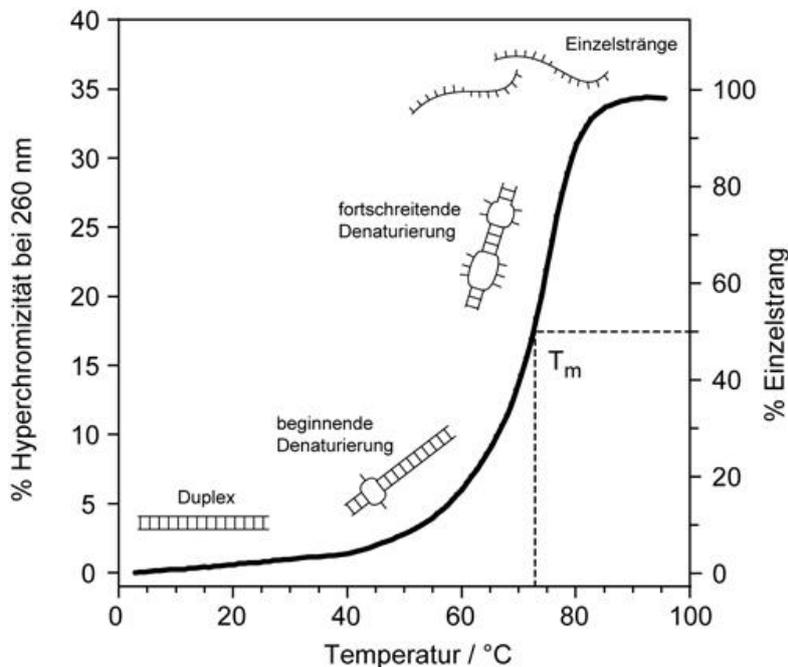


Abbildung 47: Schmelzkurve eines DNA-Duplexes.^[104]

Für die Bestimmung der Schmelztemperaturen sowie für die Circular-Dichroismus-Messungen mussten zunächst jeweils die modifizierten und unmodifizierten Oligonucleotide mit ihren komplementären Strängen hybridisiert werden. Die unmodifizierten sowie komplementären Oligonucleotide waren kommerziell erhältlich und wurden von der Firma Invitrogen bezogen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Kommerziell bezogene Oligonucleotide der Firma Invitrogen.

Oligonucleotid	Sequenz
65	5'-CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GGT TAA TTT-3'
66	5'-CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GGT TAA ATT-3'
67	3'-GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCA ATT TAA-5'
68	3'-GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCA ATT AAA-5'

Für die Hybridisierung wurden die entsprechenden Stränge im Puffersystem (siehe Kapitel 7.2) für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt und in einem Zeitraum von über drei Stunden langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die anschließenden T_M -Messungen wurden in einem Temperaturbereich von 20 °C bis 80 °C durchgeführt. Dabei wurden die Proben jeweils dreimal erhitzt und wieder abgekühlt. Die Messung der Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm vorgenommen. Aus den erhaltenen sigmoidalen Kurve konnten nun die T_M -Werte ermittelt werden. Hierzu wurde durch die Boltzmann-Methode das Maximum der 1. Ableitung berechnet. Für alle erhaltenen Ergebnisse kann eine Standardabweichung von unter 1 °C angegeben werden.

In der nachfolgenden Tabelle sind alle gemittelten T_M -Werte der modifizierten und unmodifizierten DNA-Duplexe aufgelistet.

Tabelle 3: Ermittelte T_M -Werte der DNA-Duplexe.

DNA-Duplex	Position von <i>D-carba</i> -dTMP 28 in den Oligonucleotiden	T_M [°C]
65-68	--	57.29
53-65	26 nt	59.95
66-67	--	59.31
54-66	27 nt	61.32
55-66	26 nt, 27 nt	57.54

Für den unmodifizierten Duplex **65-68** konnte eine Schmelztemperatur von 57.29 °C ermittelt werden. Bei Betrachtung des modifizierten Duplexes **53-65** mit der Modifikation an der Position 26 ergab sich ein um ca. 2.7 °C höherer T_M -Wert. Folglich trägt der Einbau von *D-carba*-dT-Monophosphat **28** zur Stabilisierung der DNA bei.

Diese Annahme wird bei Betrachtung des nächsten Beispiels bestätigt: Auch für eine Modifikation an Position 27 konnte im Vergleich zu dem unmodifizierten Duplex **66-67**, eine um 2 °C erhöhte Schmelztemperatur festgestellt werden.

Im Gegensatz zu einer einfachen Modifikation im System ist bei einem konsekutiven Einbau von *D-carba*-dTMP **28** (Duplex **55-66**) eine Abnahme der Schmelztemperatur ersichtlich. Hierbei konnte eine Abnahme von etwa 1.8 °C im Vergleich zum unmodifizierten System **66-67** beobachtet werden.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass durch den Einbau des Analogons **28** in die DNA die thermische Stabilität beeinflusst wird, trotz des lediglich geringen strukturellen Unterschieds zum natürlichen Baustein. Ein einmaliger Einbau der Modifikation führt zu einer Stabilisierung der DNA-Struktur, wohingegen eine zweifache konsekutive Insertion eine Destabilisierung der DNA zur Folge hat.

6.1.3.2 Messungen des Circularen Dichroismus (CD)

Im Allgemeinen ist die DNA ein dynamisches Molekül, das drei verschiedene Helixformen annehmen kann (Abbildung 48).^[107] Die natürlich vorkommende rechtsgängige B-DNA wird überwiegend in allen Lebewesen beobachtet und besitzt bei 280 nm ihr Absorptionsmaximum. Die linksgängige Z-Konformation wird in stark salzhaltigen Lösungen bevorzugt und weist alternierende Purin- und Pyrimidinbasen-Sequenzen auf. Die ebenfalls rechtsgängige A-Konformation ist die Helixform, die bei niedriger Dehydratisierung vorliegt und ein Absorptionsmaximum von 265 nm sowie ein Minimum bei 210 nm aufweist.^[107]

Das Analyseverfahren des Circularen Dichroismus beschreibt die Absorption von circular polarisiertem Licht in Abhängigkeit von den optisch aktiven, chiralen Molekülen. Bedingt durch die charakteristische Lage der Maxima und Minima, die aus der Auftragung der Elliptizität gegen die Wellenlänge resultieren, kann eine Zuordnung einer entsprechenden Sekundärstruktur zu den Oligonucleotiden erfolgen (Abbildung 48). In Analogie zur Messung des Schmelzpunktes sollten die CD-Spektren der modifizierten Oligonucleotide denen ohne Modifikation gegenüber gestellt werden. Wie bereits im vorhergehenden Kapitel beschrieben, wurden die Oligonucleotide im Vorfeld der Messung hybridisiert.^[107]

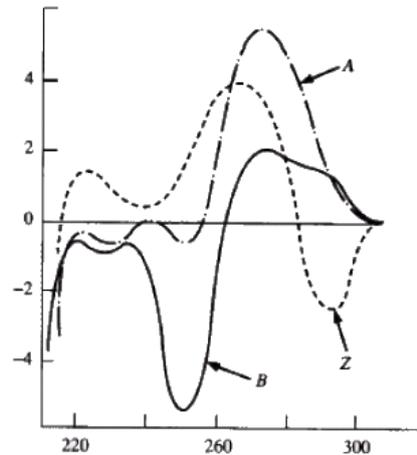


Abbildung 48: CD-Spektren der verschiedenen DNA-Konformationen.^[107]

In Abbildung 49 sind die erhaltenen Spektren der CD-Messungen der DNA-Duplexe **53-65** und **65-68** dargestellt. Daraus ist zu entnehmen, dass sowohl der unmodifizierte DNA-Duplex **65-68** als auch der modifizierte **53-65** ein Absorptionsmaximum bei 271 nm und ein -minimum von 244 nm aufweist. Dieses Muster ist charakteristisch für die B-DNA-Konformation, woraus geschlossen werden kann, dass der Einbau der Modifikation *D-carba*-dTMP **28** keinen Einfluss auf die globale Konformation der Doppelhelix hat.

Des Weiteren ist in der CD-Spektroskopie die Intensität der Elliptizität ein Maß für die Ordnung der DNA-Duplexe. Bei zunehmender Unordnung im System verflacht der Kurvenverlauf deutlich. Wie in Abbildung 49 allerdings deutlich zu erkennen ist, weisen sowohl der unmodifizierte als auch der modifizierte Duplex nahezu identische Ordnungen auf. Dies lässt vermuten, dass keine signifikante Konformationsänderung mit einem Einbau von *D-carba*-dTMP **28** einhergeht.

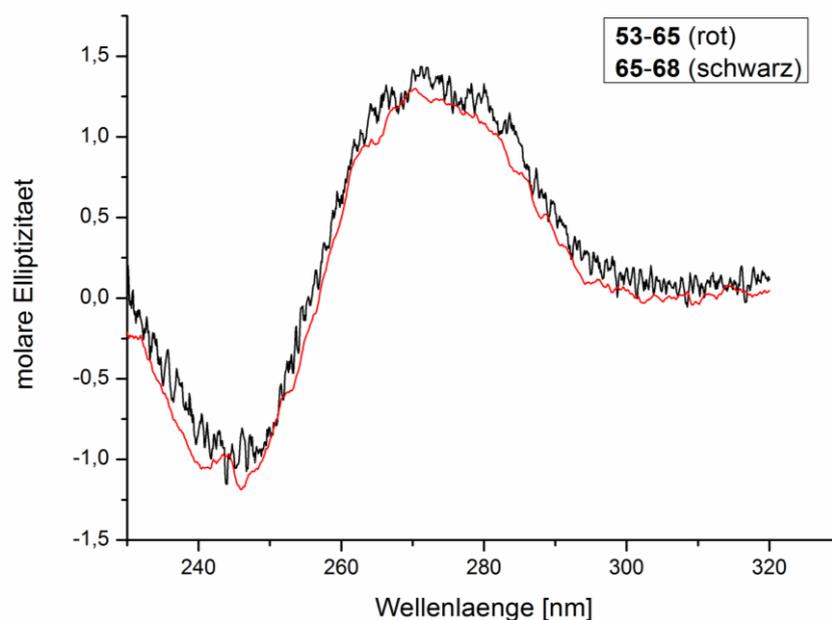


Abbildung 49: CD-Messungen der DNA-Duplexe **53-65** und **65-68**.

Bei Betrachtung der CD-Spektren der Duplexe **55-66** und **66-67** mit zwei konsekutiven Insertionen des *D-carba*-dT-Monophosphats **28** ist ersichtlich, dass der Kurvenverlauf der modifizierten Verbindung flacher ist und folglich die Unordnung im System zugenommen hat. Trotz der Zunahme dieser Unordnung, sind die charakteristischen Maxima und Minima einer B-DNA-Konformation erhalten geblieben.

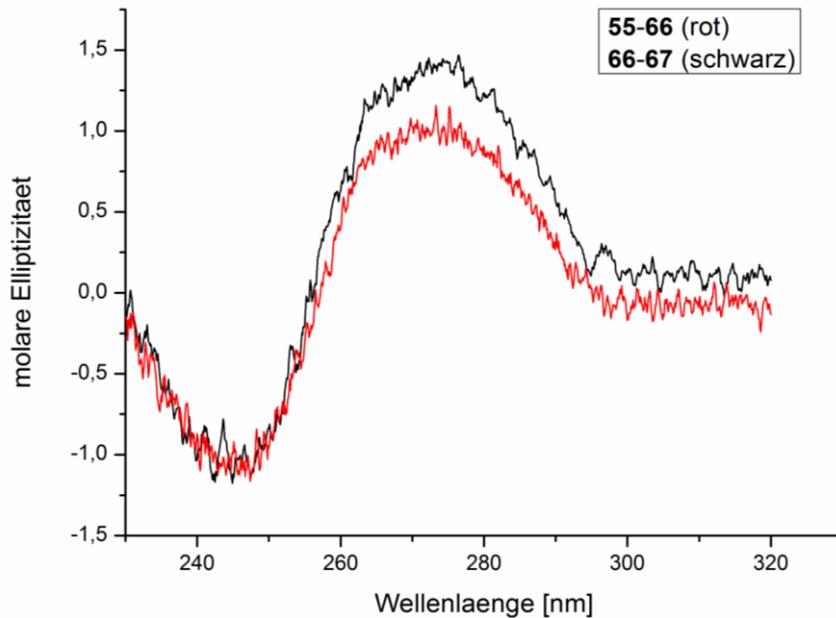


Abbildung 50: CD-Messungen der DNA-Duplexe **55-66** und **66-67**.

Zusammenfassend konnten mit Hilfe der CD-Spektroskopie wichtige Erkenntnisse gesammelt werden: Liegt lediglich eine Einfachmodifikation im Oligonucleotid vor, kann diese toleriert werden und bewirkt keine zunehmende Unordnung im Duplex-System. Dies bedeutet, dass ein einfacher Einbau des Monophosphats **28** ähnliche Wechselwirkungen mit der gegenüberliegenden Base eingehen kann wie der natürliche Thyminbaustein. Die Betrachtung des CD-Spektrums des zweifach modifizierten DNA-Duplexes **55-67** zeigt dagegen, dass durch den wiederholten Einbau des *D-carba*-dT-Monophosphats **28** eine deutliche Verflachung der CD-Kurve hervorgerufen wird, was auf eine erhöhte Unordnung im Duplex hindeutet. Daher lassen die Ergebnisse der CD-Spektroskopie den Schluss zu, dass erst der konsekutive Einbau von *D-carba*-dTMP **28** in ein Oligonucleotid einen gewissen Einfluss auf die globale DNA-Konformation hat.

6.1.3.3 Primer-Verlängerungs-Studien

Die von BOYER durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass der Einbau von D-carba-dTMP **28** in die DNA, im Vergleich zu klassischen NRTI, zu einem *delayed chain termination* Wirkmechanismus führt.^[53] Generell gilt dabei, dass bei Vorlage eines Substrates in Form des jeweiligen Triphosphates einzig das Monophosphat bei der DNA-Synthese eingebaut wird und das Pyrophosphat der Energiegewinnung (bspw. der ATP-Generierung) wieder zur Verfügung steht. Im Hinblick auf die explizite Klärung der Funktionsweise dieses Wirkmechanismus wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des Substrates D-carba-dTTP **24** in *primer extension assays* unter Verwendung der Polymerase HIV-RT untersucht. Die Auswahl des Enzyms basiert darauf, dass das zu untersuchende carbocyclische Nucleosid **16** sehr gute antivirale Eigenschaften gegenüber HIV aufweist.^[52,53,55]

Im Allgemeinen ist das Enzym HIV-RT eine virale Polymerase, welche zu der Familie der Reversen Transkriptasen gehört. *In vivo* ist dieses Enzym essentiell für die Replikation der HI-Viren. Aufgrund dieser Tatsache zählt die HIV-RT zu einem der wichtigsten therapeutischen Angriffspunkte im Zuge der Entwicklung innovativer HIV-Wirkstoffe.

Neben einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase und einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase weist die HIV-RT auch eine RNase-H-Aktivität auf. Bei der RNase-H-Domäne handelt es sich um eine unspezifische Endoribonuklease, die RNA/DNA-Duplexe erkennt und den RNA-Teil entfernt.^[108,109] Bezüglich ihrer Quartärstruktur ist die HIV-RT ein Heterodimer, welches aus zwei ähnlichen Untereinheiten besteht.

Die größere der beiden Untereinheiten wird aufgrund der molekularen Masse von 66 kDa als p66 bezeichnet und beherbergt neben der Polymeraseaktivität auch die RNase-H-Domäne.^[108,109] Die kleinere 51 kDa Untereinheit (p51) ist ein proteolytisches Spaltprodukt der p66 Untereinheit, der die RNase-H-Domäne fehlt.^[108,109]

Um einen Einblick in den Wirkmechanismus zu erhalten, wurde in dieser Arbeit das Konzept der Prozessierung der HIV-RT ausgehend von dem viralen RNA-Genom bis hin zum DNA-Doppelstrang zu Grunde gelegt und in den durchgeführten *primer extension assays* untersucht. Als vielseitige Polymerase komplettiert die HIV-RT zunächst die einzelsträngige RNA zu einem RNA-DNA-Komplex (Schritt 1, Abbildung 51). Im Folgenden wird durch die RNase-H-Aktivität der Abbau der RNA im gebildeten Hybridstrang katalysiert (Schritt 2). Durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität der HIV-RT erfolgt im Anschluss der Aufbau des doppelsträngigen DNA-Strangs (Schritt 3).^[108,109]

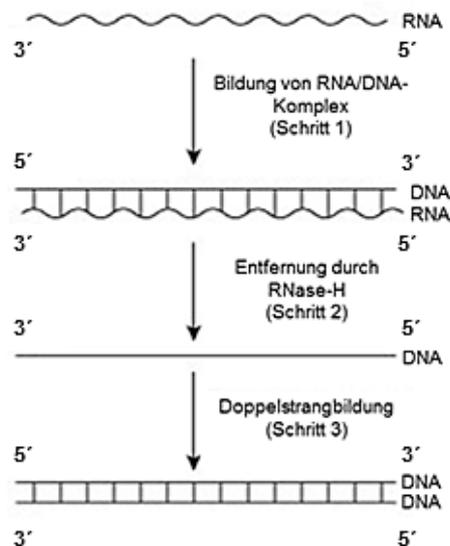


Abbildung 51: Schematische Darstellung der Bildung eines DNA-Doppelstrangs durch die HIV-RT.^[110]

In dieser Arbeit wurde im Zuge der *primer extension assays* ein ³²P-markierter Primer (25 nt) verwendet, der jeweils mit verschiedenen modifizierten und unmodifizierten Oligonucleotiden (30 nt) hybridisiert wurde. Nach Bindung der viralen HIV-RT an den Primer/Templat-Komplex wurde der Einbau der entsprechenden komplementären Nucleotide verfolgt, wobei sowohl die Methodik des *standing-starts* als auch die des *running-starts* angewandt wurde. In einer *standing-start* Reaktion bindet die Polymerase an die zu untersuchende Position des Primer/Templat-Komplexes und inseriert die Modifikation als n+1. Bei einem *running-start* Experiment hingegen startet die Polymerase die DNA-Synthese nicht mit dem Einbau der Modifikation, sondern hat bereits ein natürliches Nucleotid vor dem Nucleotidanalogon eingebaut.

Die Analyse der erhaltenen Reaktionsprodukte der Assays wurde durch eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt und diese autoradiographisch dokumentiert. Erfolgt durch die HIV-RT die Insertion eines entsprechenden Nucleotids, so ist aus dem erhaltenen Autoradiogramm eine Elongation des radioaktiven Primers um n+1 (hier = 26 nt) ersichtlich. Um eine eindeutige Aussage über die Anzahl der Insertionen treffen zu können, wurde in jeder Versuchreihe eine Positiv- sowie eine Negativ-Kontrolle mitgeführt. Zur Markierung des „Startpunktes“ (25 nt) wurde bei der Negativ-Kontrolle auf den Zusatz einer Polymerase verzichtet, sodass keine Verlängerung des Stranges erfolgen konnte. Zur Erleichterung der Darstellung wird die Negativ-Kontrolle im Folgenden mit „-“ gekennzeichnet, die Positivprobe hingegen mit „+“. Entsprechend der zu beantwortenden Fragestellung wurden in den durchgeführten *primer extension assays* dATP (A), dCTP (C), dGTP (G), dTTP (T) oder D-*carba*-dTTP (T*) **24** hinzugegeben.

Wie bereits in Abbildung 51 gezeigt, ist der Katalysezyklus der viralen HIV-RT zur Bildung doppelsträngiger DNA ein mehrstufiger Prozess. Angelehnt an diesen Katalysezyklus fokussiert sich der nachfolgende Teil der Arbeit auf folgende Fragestellungen:

- Auf welcher Ebene (RNA oder DNA) weist D-*carba*-dTTP **24** ein größeres Inhibitionspotential auf?
- Zeigt der Einbau von D-*carba*-dTTP **28** eine Abhängigkeit gegenüber verschiedenen Sequenzen auf DNA-Ebene?
- Welchen Einfluss haben die mit D-*carba*-dT-modifizierten Oligonucleotide **53**, **54** und **55** auf die DNA-Synthese?
- Wie ist der Einfluss bei zusätzlicher Zugabe von D-*carba*-dTTP **24** auf ein modifiziertes Oligonucleotid in der DNA-Synthese?

6.1.3.3.1 Vergleich des Inhibierungspotentials von D-*carba*-dT-Triphosphat **24** auf RNA- und DNA-Ebene

Mit Hilfe von *primer extension assays* sollte in Anlehnung an die Studien von BOYER ein Vergleich des Inhibitionspotenzials von D-*carba*-dTTP **24** auf DNA- sowie auf RNA-Ebene erfolgen.^[53] Entsprechend der Herangehensweise von BOYER wurde die ausgewählte randomisierte Sequenz in RNA- sowie DNA-Form in den *primer extension assays* als Templat der Polymerase zur Verfügung gestellt (Abbildung 52).

In Abbildung 52 (linke Seite) ist das erhaltene Resultat auf RNA-Ebene gezeigt. Die Probe „N*“ (A, C, G und T*) zeigt eine vollständige Elongation des Primer zu n+5 (30 nt). Aufgrund der fehlenden Korrekturlesefunktion der HIV-RT können auch Insertionen von nicht kanonischen Substraten erfolgen. Solche Fehleinbauten sind in den Proben „T*, C, A“ und „T*, C“ erkennbar. Während in der Probe „T*, C, A“ nur eine maximale Elongation von n+3 (28 nt) erfolgen sollte, wurde in geringem Maße eine vollständige Verlängerung des Stranges festgestellt. In der Probe „T*, C“ wird die Auswirkung der Fehleinbauten noch deutlicher: Aufgrund der vorliegenden Substrate in der Probe war lediglich eine maximale Elongation bis n+2 zu erwarten, wobei allerdings, trotz der fehlenden Substrate A und G, teilweise eine vollständige Verlängerung des Primerstranges stattfindet. Wie im Vorwege zu erwarten war, wird in der letzten Probe „T*“ der quantitative einfache Einbau zu n+1 (26 nt) beobachtet.

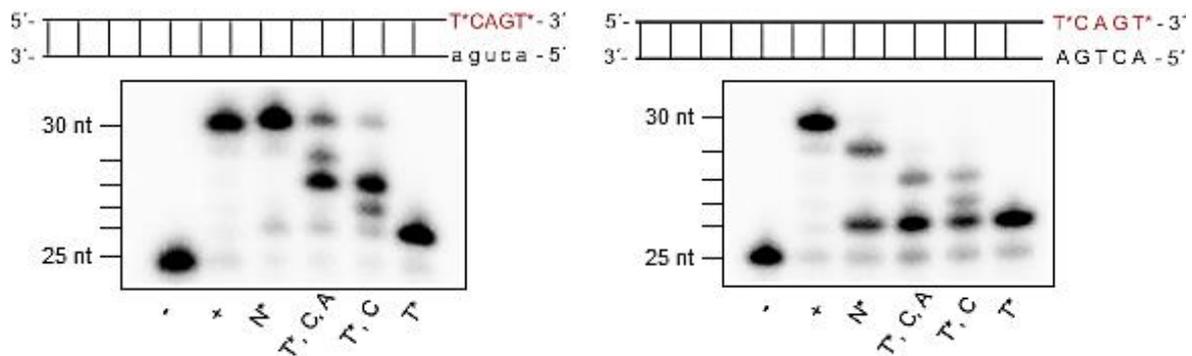


Abbildung 52: Autoradiogramme der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese mit HIV-RT unter Verwendung eines DNA- bzw. RNA-Templats.

In Abbildung 52 (rechtes Autoradiogramm) sind die Ergebnisse der Untersuchung auf DNA-Ebene dargestellt. Die Probe N* zeigt in Folge des Einbaus von *D-carba*-dTTP **28** zunächst einen sofortigen Kettenabbruch (n +1; 26 nt). Analog zu den Ergebnissen von BOYER setzt die DNA-Synthese jedoch langsam wieder ein und bricht bei n+4 (29 nt) endgültig ab.^[53] Es kommt demnach zu einer *delayed chain termination*. Um zu untersuchen, ob der Kettenabbruch bei n+4 von einem Fehleinbau bzw. Punktmutation herrührt, wurde dem Reaktionsansatz auf Bahn 4 kein G zugesetzt. In Abwesenheit von G ist eine maximale Strangverlängerung von n+3 zu erkennen, wobei auch hier die DNA-Synthese nach dem Einbau zu n+1 abbricht und dann erneut einsetzt. Wird in diesem Zusammenhang die Auftrennung der nachfolgenden Probe („T*, C“) betrachtet, so sollte in Abwesenheit von G und A eine maximale Verlängerung von n+2 zu erkennen sein. Stattdessen zeigt das Autoradiogramm jedoch einen marginalen Einbau bis n+3. Daraus kann geschlossen werden, dass hier aufgrund der hohen Fehlerrate der HIV-RT Polymerase eine Punktmutation vorliegt.

Diese Punktmutation könnte demnach einer der Gründe sein, warum in der Probe „N*“ ein Strangabbruch bei n+4 erkennbar ist. Wird der Polymerase nur „T*“ (D-*carba*-dTTP **24**) als Substrat angeboten, erfolgt erwartungsgemäß nur ein einfacher Einbau zu n+1.

Basierend auf den Ergebnissen von BOYER wurde erwartet, dass nach dem Einbau des carbocyclischen Analogons **28** das größere Inhibierungspotential auf der RNA-Ebene vorliegt.^[53] In seinen Studien konnte auf RNA-Ebene ein *delayed chain termination* Mechanismus beobachtet werden. Dabei wurde ein kurzzeitiger Abbruch der DNA-Synthese nach Insertion von D-*carba*-dTMP **28** festgestellt.^[53]

Jedoch zeigen die erhaltenen Resultate der vorliegenden Arbeit eindeutig, dass auf RNA-Ebene kein Abbruch der Synthese hervorgerufen wird (vgl. Abbildung 52; linker Abschnitt). Auf RNA-Ebene toleriert die virale HIV-RT das Triphosphat **24** als Substratersatz zu dem natürlichen Nucleotid T und führt die vollständige Elongation des Stranges aus.

Dahingegen zeigt sich auf DNA-Ebene, wie auch in der Literatur beschrieben, der Abbruch der DNA-Synthese nach dem *delayed chain termination* Mechanismus. Analog zu den Ergebnissen von BOYER ist die DNA-Synthese nach dem Einbau des Analogons (n+1) zunächst, gemäß des *immediate chain termination* Mechanismus, unterbrochen, jedoch setzt die DNA-Synthese wieder zu einem gewissen Grad ein und verlängert den DNA-Strang bis n+4.^[53] An diesem Punkt bricht die DNA-Synthese endgültig ab, sodass in der Summe ein *delayed chain termination* Wirkmechanismus festzustellen ist.^[53]

6.1.3.3.2 Untersuchung der Auswirkungen von D-*carba*-dTTP **24** auf verschiedene Sequenzen

Auf Grundlage der zuvor beschriebenen Ergebnisse wurde im Zuge der weiteren Aufklärung des Wirkmechanismus nachfolgend auf zusätzliche Untersuchungen mit RNA-Sequenzen verzichtet. Dahingegen zeigten die Ergebnisse auf DNA-Ebene, dass das Substrat **24** einen wesentlichen Einfluss auf die DNA-Synthese im Enzym-DNA-Komplex hat, weshalb sich im Weiteren auf die DNA-Ebene fokussiert wurde.

Standing-start-Reaktion mit anschließender homogener Sequenz

In den von BOYER durchgeführten Studien konnte festgestellt werden, dass nach dem Einbau von D-*carba*-dT-Monophosphat **28** die Polymerase noch ein weiteres Nucleotid insertieren kann, bevor ein Abbruch der DNA-Synthese durch eine homogene Sequenzabfolge von drei konsekutiven Cs hervorgerufen wird.^[53] Daher wurde in einer weiteren Studie eine Sequenz untersucht, die direkt nach der Insertion von D-*carba*-dTMP **28** eine homogene Abfolge aufwies. Auf diese Weise sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der homogenen Sequenz und dem Substrat D-*carba*-dTTP **24** auf den Wirkmechanismus untersucht werden. In Abbildung 53 (linker Abschnitt) ist die gewählte Sequenz mit dem dazugehörigen Autoradiogramm aus dem *primer extension assay* gezeigt. Abermals sind die Referenzproben („-“, „+“) mit aufgeführt. Wie aus der Zusammensetzung des Analysenansatzes erkennbar ist, sollte beispielsweise in der Probe „N“ eine vollständige Elongation des DNA-Stranges erfolgen. Jedoch stoppt die DNA-Synthese nach der Insertion vom Monophosphat **28** nahezu vollständig. Nur zu einem sehr kleinen Prozentsatz kann die DNA-Synthese wieder aufgenommen werden, sodass die Formierung einer geringen Menge des n+4-Primers beobachtet wird.

Allerdings kommt es zu keiner vollständigen Strangbildung. In der Untersuchung der Probe „A, T“ wurden korrelierende Resultate erhalten. In der Probe „T“ fand lediglich der einfache Einbau von D-*carba*-dTMP **28** statt. Analoge Ergebnisse konnten auch bei den Experimenten mit den zwei übrigen homogenen Templatsträngen (ACCCC, AGGGG; s. Anhang 10.2) erhalten werden.

Um auszuschließen, dass die Auffälligkeiten die Folge von Beeinflussungen auf Basis der genutzten Sequenz waren, wurde die Untersuchung in einem Ansatz wiederholt, der keine Modifikationen beinhaltet. Die Ergebnisse mit dem unmodifizierten Ansatz sind im rechten Teil der Abbildung 53 gezeigt. Aus dieser Darstellung ist ersichtlich, dass in den Proben „N“ und „A, T“ eine vollständige Elongation des Primer (n+5) erfolgt. Auch ist in den anderen Proben kein Fehleinbau festzustellen. Demnach kann ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Strangabbrüche im linken Autoradiogramm eine Folge der verwendeten Sequenz sind. Vielmehr kann geschlussfolgert werden, dass es zu einem sofortigen Strangabbruch kommt, sofern sich nach dem eingebauten D-*carba*-dTMP **28** eine homogene Sequenz anschließt. Dies bedeutet, dass von dem Monophosphat **28** ein starker Einfluss auf das System während der DNA-Synthese ausgeht.

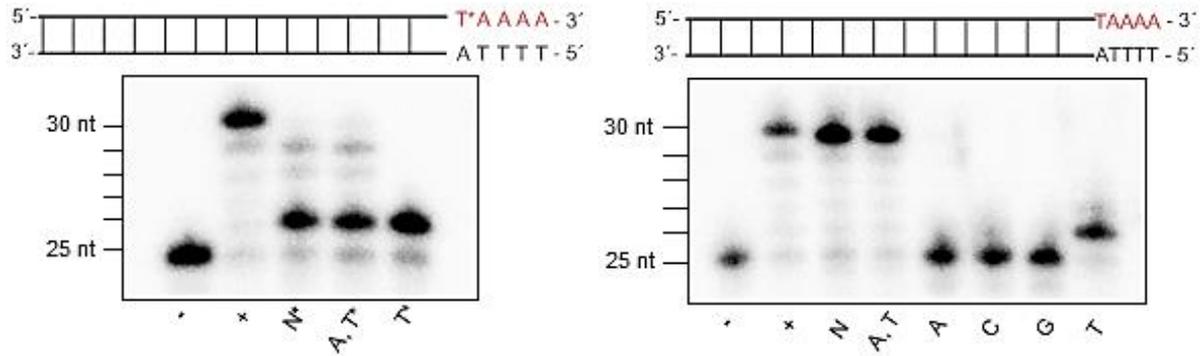


Abbildung 53: Autoradiogramme der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese zur Untersuchung des Einflusses homologer Reihen.

Diese Ergebnisse weisen Ähnlichkeiten mit den Resultaten von BOYER auf. Wie bereits erwähnt, wurde in dessen Studie eine ähnliche DNA-Sequenz untersucht.^[53] Nach dem Einbau der Modifikation **28** erfolgte ein einzelner kanonischer Einbau, bevor sich in der Sequenz eine Abfolge von 3 Cs anschloss. In seinen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass nach der Insertion des *D-carba*-dT-Monophosphats **28** das virale Enzym HIV-RT nur stark verlangsamt mit der DNA-Synthese fortfahren kann, bevor diese nach einem *delayed chain termination* Wirkmechanismus vollständig zum Erliegen kommt.^[53]

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde eine abgewandelte Variante der Sequenz aus der Studie um BOYER verwendet.^[53] Die Sequenzabfolge wurde so gewählt, dass sich direkt nach dem Einbau des carbocyclischen Analogons **28** eine homogene Sequenz anschloss. Der Effekt einer verlangsamt DNA-Synthese, wie sie von BOYER beobachtet wurde, kann dadurch nochmals verstärkt werden. Nach der Insertion des Monophosphats **28** erfolgt ein nahezu vollständiger Abbruch der DNA-Synthese. Daraus ergibt sich, dass ein Einbau von *D-carba*-dTMP **28** und eine sich anschließende homogene Sequenz überwiegend zu einem *immediate chain termination* Wirkmechanismus führt und nicht zu einem *delayed chain termination* Wirkmechanismus.

Alternierende Sequenzen als „*running-start*“-Reaktionen

Im folgenden Experiment sollte *D-carba*-dTMP **28** ausgehend von dem Triphosphat **24**, in einem so genannten *running-start*-Versuch, alternierend an den Position n+2 und n+4 eingebaut werden.

In der Abbildung 54 (linke Seite) ist die alternierende Sequenz mit -TATAT gezeigt. Wie im Radiogramm deutlich zu erkennen ist, bricht in der Probe „N*“ die DNA-Synthese nach dem Einbau von *D-carba*-dTMP **28** zunächst ab (n+2). Jedoch setzt die Elongation geringfügig wieder ein, sodass es zu einer zweiten Insertion von *D-carba*-dTMP **28** kommt (n+4).

Im Weiteren kann allerdings keine vollständige Elongation des Stranges beobachtet werden. In der Probe „A, T*“ werden korrelierende Resultate erhalten. Aufgrund einer nicht kanonischen Basenpaarung ist in der Probe „T*“, wie erwartet, kein Einbau von D-*carba*-dT-Monophosphat **28** erkennbar.

Im rechten Abschnitt der Abbildung 54 ist das Autoradiogramm gezeigt, das mit der alternierenden Sequenz -CACAC erhalten wurde. Verglichen mit der Sequenz -TATAT ist ein wesentlicher Unterschied erkennbar: Unter Verwendung der Primersequenz -CACAC bricht die Elongation des DNA-Stranges nicht schon nach dem Einbau des ersten D-*carba*-dTMP **28** an der Stelle n+2 ab, sondern erst nach Inkorporation des zweiten Bausteins D-*carba*-dTMP **28** (n+4).

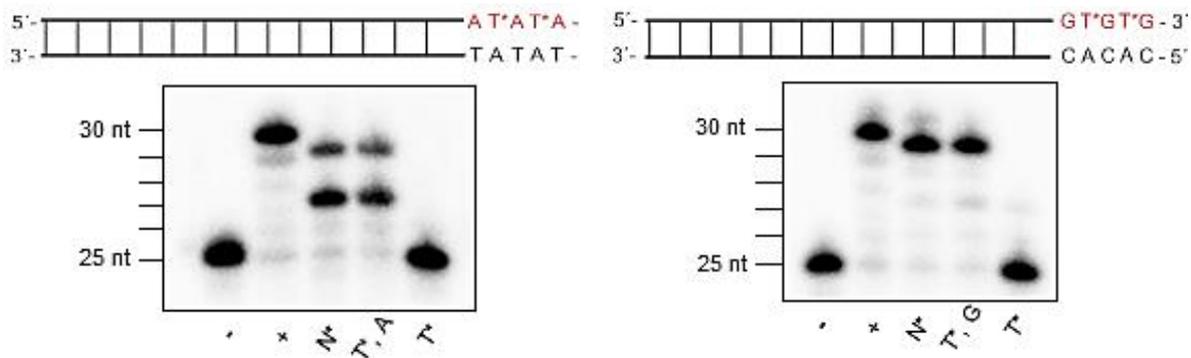


Abbildung 54: Autoradiogramme der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese unter Verwendung alternierender Endsequenzen (links: -TATAT; rechts -CACAC).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Analysen der TATAT-Sequenz zu dem Abschnitt „*Standing-start*-Reaktion mit anschließender homogener Sequenz“ gemachten Beobachtungen konsistente Ergebnisse liefern. In beiden Fällen findet nach der Insertion von D-*carba*-dTMP **28** bevorzugt eine *immediate chain termination* statt. Des Weiteren kann aber jeweils zu einem kleinen Prozentsatz ein Wiedereinsetzen der DNA-Synthese beobachtet werden, die eine Strangverlängerung bis n+4 ermöglicht. Im Gegensatz dazu, bricht die DNA-Synthese in der CACAC-Sequenz erst nach dem zweiten Einbau des Monophosphats **28** ab und entspricht demnach dem *delayed chain termination* Wirkmechanismus. Ähnliche Beobachtungen können ebenfalls mit der GAGAG-Sequenz gemacht werden.

Insgesamt bedeutet dies, dass die vorherige Base in der Sequenz vor der Inkorporation des Monophosphats **28** einen wesentlichen Einfluss auf den Wirkmechanismus hat. Nimmt C respektive G die Position vor der Modifikation ein, hat das einen direkten Einfluss auf die Verlängerung des Stranges zur Folge. Diese Basen erlauben vermutlich eine Überbrückung des Einbaus von D-*carba*-dTMP **28**, wohingegen T vor dem Einbau des D-*carba*-dT-Monophosphats **28** eher zu einem sofortigen Kettenabbruch führt.

Unter der Annahme, dass die vorherige Base eine wichtige Rolle im Wirkmechanismus einnimmt, müssen die bisher erhaltenen Resultate nochmals ergänzt werden. Wie aus der folgenden Abbildung ersichtlich, schließt der in diesen Studien nicht variierte Teil der Templatsequenzen immer mit einem A (Position 25 nt) ab. Das bedeutet, dass neben einem Effekt von T auch durch A in der entsprechenden Position ein *immediate chain termination* Wirkmechanismus begünstigt wird.

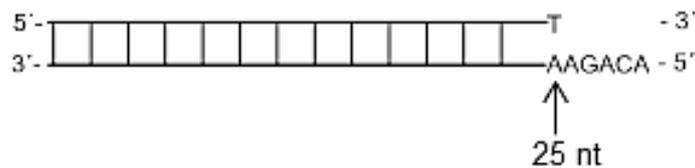


Abbildung 55: Schematische Visualisierung des nicht variierten Teils der verwendeten Templatsequenzen.

Auswirkungen der Verwendung randomisierter Sequenzen

Aus den vorangegangenen Studien geht hervor, dass die Sequenzabfolgen mit G oder C in Kombination mit *D-carba*-dTMP **28** einen wesentlichen Einfluss auf die DNA-Synthese besitzen. Im Gegensatz zu der alternierenden Sequenz -TATAT führt die entsprechende Sequenz mit C oder G nach der ersten Insertion des Monophosphats **28** nicht zu einem Abbruch der DNA-Synthese, sondern zu einer Strangverlängerung bis $n+4$. Diese Erkenntnis bezüglich des Einflusses von G und C auf das Elongationsverhalten sollten in einer weiteren Studie mit einer randomisierten Sequenz verifiziert werden.

Mit Hilfe eines *standing-start*-Ansatzes sollte zunächst *D-carba*-dTMP **28** ausgehend von dem Substrat *D-carba*-dTTP **24** alternierend an den Positionen $n+1$, $n+3$ und $n+5$ in den wachsenden Strang eingebaut werden. Das Autoradiogramm in Abbildung 56 zeigt die Elongation des Stranges in Gegenwart von A, C, G und T* (Probe „N“). Obwohl eine vollständige Verlängerung des Stranges theoretisch möglich wäre, wird aus dem Autoradiogramm ersichtlich, dass bei diesem Ansatz Strangabbrüche bei $n+1$, $n+3$ und $n+4$ auftreten. Während die DNA-Synthese nach den Abbrüchen an den Positionen $n+1$ und $n+3$ langsam wieder einsetzt, kommt es bei $n+4$ zu einer endgültigen Termination der Strangsynthese. Auch in der Probe „T“, C, G“ erfolgt keine vollständige Elongation des Stranges. Vielmehr wird ein analoges Ergebnis zur Probe „N“ erhalten. Bei den übrigen zwei Proben („T“, C“ und „T“) kann nur der kanonisch zu erwartende Einbau beobachtet werden.

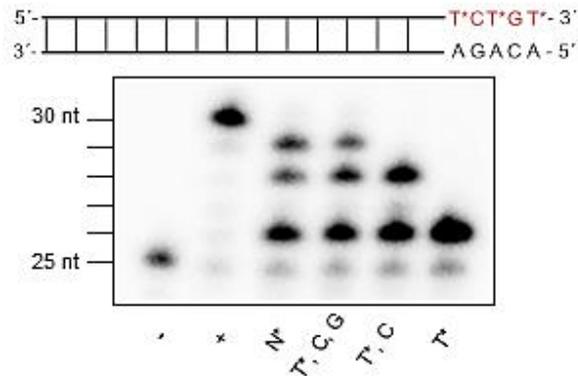


Abbildung 56: Autoradiogramm der gelelektrophoretischen Trennung der *primer extension assays* zur Untersuchung einer randomisierten Basenabfolge.

Insgesamt kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass die Nucleoside G und C wiederholt einen wesentlichen Einfluss auf den Wirkmechanismus in der DNA-Synthese unter Verwendung der HIV-RT zeigen. Im Speziellen wird dieser Einfluss in den alternierenden Sequenzen (-TATAT, -CACAC) deutlich. Dort zeigt sich der ausgeprägte Einfluss der vorherigen Base, wie z.B. G oder C, welcher in einer Verlängerung des Stranges resultiert. Dies impliziert, dass bei Anwesenheit von G und C die DNA-Synthese nach einem *delayed chain termination* Wirkmechanismus beendet wird. Diese Resultate können bei Verwendung einer randomisierten Sequenz bestätigt werden, wobei der signifikante Einfluss der Base A an der Position 25 nt ebenfalls zu beobachten ist. Nach dem Einbau von *D-carba*-dTMP **28** an Position n+1 kommt die DNA Synthese etwa zur Hälfte zum Erliegen, wobei als Ursache ein *immediate chain termination* Wirkmechanismus angeführt werden kann.

Eine Auswirkung auf den Wirkmechanismus seitens der gegenüber *D-carba*-dT-Monophosphat **28** nachstehenden Base kann nicht beobachtet werden. Nach dem Einbau des Nucleotids **28** erfolgt stattdessen der sofortige Kettenabbruch der DNA-Synthese. In den untersuchten homogenen Sequenzen lässt sich generell kein Einfluss der verschiedenen Basen nachweisen.

6.1.3.3.3 Untersuchung der Auswirkung von *D-carba*-dTMP **28** als Teil der Ablesematrix

Um den Effekt von *D-carba*-dTMP **28** als Bestandteil der Ablesematrix auf das Elongationsverhalten zu bestimmen, muss theoretisch vorausgesetzt sein, dass in den ersten beiden Schritten des Katalysezyklus der viralen Polymerase *D-carba*-dTMP **28** kaum ein Inhibitionspotential zeigt. Diese Annahme impliziert, dass eine vollständige Elongation des DNA-Strangs erfolgen kann.

Demzufolge wurde nun überprüft, ob neben den bereits beschriebenen Insertionen des Monophosphats **28** in den Tochterstrang auch ein modifizierter Templatstrang Auswirkungen auf die DNA-Synthese aufweist. Dafür sollten die natürlichen Substrate in bereits modifizierte DNA-Komplexe eingebaut werden.

Die Abbildung 57 (linker Abschnitt) zeigt die Ergebnisse ausgehend von dem Templatstrang mit einer Modifikation an Position 26 nt, wohingegen das rechte Autoradiogramm die Ergebnisse eines Templatstrangs mit einer Modifikation an der Position 27 nt darstellt. Beide Autoradiogramme zeigen, dass in den untersuchten DNA/DNA-Komplexen der jeweiligen Proben „N“ (bestehend aus A, C, G und T), trotz der beinhalteten einfachen Modifikation im Templatstrang, in beiden Fällen ein Umsatz zu n+5 erfolgen kann.

Allerdings zeigt sich zunächst auch in beiden Proben ein Strangabbruch bei n+4, was darauf schließen lässt, dass D-*carba*-dTTP **28** auch innerhalb des Templatstrangs im Prozess der Transkription von viraler einzelsträngiger RNA in doppelsträngige DNA einen Effekt ausübt. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass obwohl zwar ein Strangabbruch bei n+4 zu beobachten ist, die DNA-Synthese in der Folge zu einem gewissen Maße wieder einsetzt und den Strang letztlich bis n+5 verlängert.

Darüber hinaus sind in den übrigen Proben keine oder nur die entsprechenden kanonischen Insertionen (Probe „A“) zu beobachten. Das bedeutet, dass D-*carba*-dT-Monosphosphat **28** im Templatstrang keine Punktmutation durch einen nicht-kanonischen Einbau hervorruft.

In der Konsequenz zeigt sich also, dass sich das Inhibierungspotential von D-*carba*-dTTP **24**, als Substrat auf DNA-Ebene, von dem Inhibierungspotential von D-*carba*-dTTP **28**, als bereits integrierte Modifikation im Templatstrang, unterscheidet. Dient das Triphosphat **24** während der DNA-Synthese als Substrat, so sind die Auswirkungen des *delayed chain termination* bzw. des *immediate chain termination* Mechanismus zu beobachten. Befindet sich jedoch die einfache Modifikation **28** im Templatstrang, so wird das Monophosphat **28** von der Polymerase im aktiven Zentrum toleriert, wodurch sogar die Bildung des kompletten Primerstranges erfolgen kann.

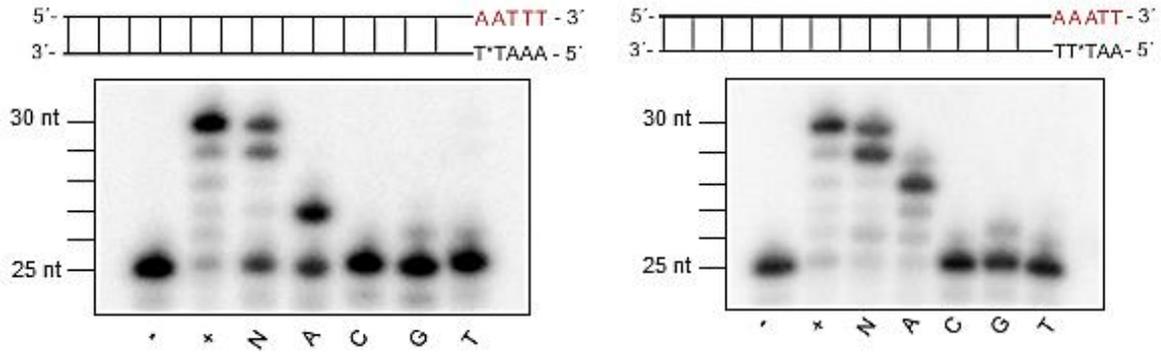


Abbildung 57: Autoradiogramme der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese zur Untersuchung des Einflusses eines einfachen Einbaus von *D-carba*-dTMP **28** an den entsprechenden Positionen.

Anhand der zuvor erhaltenen Ergebnisse wurde nun überprüft, inwieweit sich die Anzahl der Modifikationen im System auf den Wirkmechanismus auswirkt. Für diese Untersuchung wurde ein Templatstrang mit einer zweifachen Modifikation (Position 26 und 27) verwendet. Aus dem erhaltenen Autoradiogramm (Abbildung 58) wird deutlich, dass mit steigender Anzahl an Modifikationen im Templatstrang ein verzögerter Kettenabbruch in der DNA-Synthese eintritt ($n+4$). Eine vollständige Strangverlängerung wird dadurch unterbunden. Das vorliegende System toleriert zunächst die zwei Modifikationen an den Positionen 26 und 27 im Templatstrang.

Schließlich kommt die Synthese bei $n+4$ nach einem *delayed chain termination* Wirkmechanismus zum Erliegen. Dieses Ergebnis offenbart, dass mit zunehmender Anzahl an Modifikationen im Templatstrang deren Einfluss auf den Abbruchmechanismus stärker ausfällt. Analog zu den Ergebnissen aus Abbildung 57 ist in den weiteren Proben kein oder nur der kanonische Einbau von AMP zu erkennen.

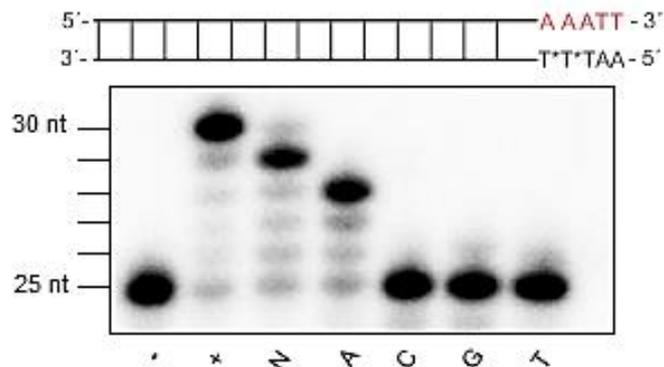


Abbildung 58: Autoradiogramm der gelelektrophoretischen Trennung der *primer extension assays* zur Untersuchung des Einflusses mehrerer Modifikationen von *D-carba*-dTMP **28** im Templatstrang.

Einfluss von D-carba-dT-Monophosphat 28 im Templatstrang bei gleichzeitiger Verfügbarkeit von D-carba-dT-Triphosphat 24 als Substrat

In dieser Phase der Prozessierung des viralen RNA-Genoms zu dem DNA-Doppelstrang ist der Effekt von D-carba-dTMP 28, anhand der erhaltenen Ergebnisse, nicht so ausgeprägt, wie in einer früheren Phase (Vergleich Abbildung 51, Schritt 1 und 3). Zusätzlich zu den bisher durchgeführten Studien besteht allerdings auch die Möglichkeit, dem bereits mit D-carba-dTMP 28 modifizierten DNA/DNA-Komplex im Assay wiederum das D-carba-dTTP 24 als Substrat zur Verfügung zu stellen. Diese Untersuchungen wurden mit den identisch modifizierten DNA/DNA-Komplexen durchgeführt, die bereits im vorigen Kapitel Einsatz fanden.

In den Studien des vorliegenden Abschnittes sollte das Monophosphat 28 an den Positionen n+3, n+4 und n+5 (Abbildung 59; linke Seite) und n+4 und n+5 (Abbildung 59; rechte Seite) eingebaut werden. Analog zu den Ergebnissen der vorherigen Experimente wird zunächst die Modifikation in den entsprechenden Templatsträngen überwunden. Das linke Autoradiogramm der Abbildung 59 zeigt in den jeweiligen Proben „N“ und „A, T“ einen Abbruch der DNA-Synthese bei n+3. Jedoch setzt ein kleiner Prozentsatz der DNA-Synthese wieder ein und verlängert den Strang mit dem Einbau von D-carba-dTMP 28 bis n+4, sodass diese Reaktion überwiegend einem *immediate chain termination* Mechanismus folgt, aber ebenfalls zu einem kleinen Prozentsatz dem *delayed chain termination* Wirkmechanismus.

Bei Betrachtung der Proben „N“ und „A, T“ im rechten Autoradiogramm, wird ersichtlich, dass auch hier die Modifikation in der DNA-Synthese überwunden wird. Nach Tolerierung der Modifikation im Templatstrang durch die Polymerase kann D-carba-dTMP 28 zu n+4 eingebaut werden, wobei danach ein sofortiger vollständiger Strangabbruch zu beobachten ist. Das bedeutet, dass zwar die Modifikation im Templatstrang in der DNA-Synthese toleriert wird, aber durch die Insertion des Monophosphats 28 ein Abbruch der DNA-Synthese herbeigeführt wird.

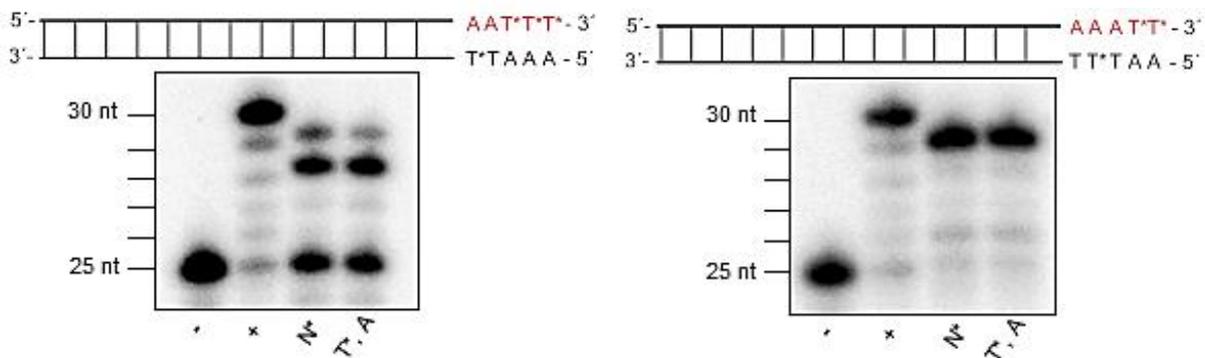


Abbildung 59: Autoradiogramm zur Untersuchung der Auswirkungen der Modifikation D-carba-dTMP 28 im Templatstrang sowie bei zusätzlicher Bereitstellung des Substrats D-carba-dTTP 24.

Eine analoge Untersuchung an dem zweifachmodifizierten Templatstrang zeigt, dass in beiden Proben „N*“ und „A, T*“ ebenfalls ein Abbruch bei n+4 verursacht wird (Abbildung 60). Auch in diesem Beispiel wird in der DNA-Synthese zunächst die zweifache Modifikation im Templatstrang überwunden, um direkt nach dem Einbau des Monophosphats **28** (n+4) einen Abbruch der Synthese nach einem *immediate chain termination* Wirkmechanismus hervorzurufen.

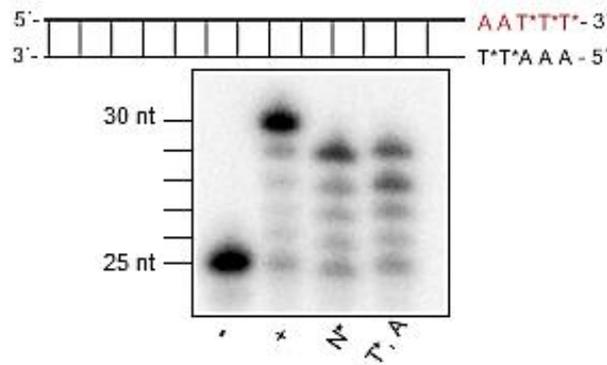


Abbildung 60: Autoradiogramm der gelelektrophoretischen Trennung der *primer extension assays* zur Untersuchung mehrerer Modifikationen D-*carba*-dTMP **28** im Templatstrang sowie der Verfügbarkeit von D-*carba*-dTTP **24** als Substrat.

6.1.3.3.4 Zusammenfassung der Resultate zur Aufklärung der Funktionsweise des Wirkmechanismus mittels *primer extension assays*

Das übergeordnete Ziel der *primer extension assays* war die Untersuchung der ungeklärten Funktionsweise des *delayed chain termination* Wirkmechanismus ausgehend von dem Substrat D-*carba*-dTTP **24** unter Verwendung der Polymerase HIV-RT. Die gewonnenen Ergebnisse zeigen unter anderem, dass im Gegensatz zu den Ergebnissen von BOYER nach dem Einbau von D-*carba*-dTMP **28** auf RNA-Ebene kein Abbruch der DNA-Synthese erfolgt. Allerdings kann das Inhibitionspotential auf der DNA-Ebene bestätigt werden.

Angelehnt an die Untersuchungen von BOYER wurde in unterschiedlichen DNA-Sequenz-Untersuchungen überprüft, inwieweit die Insertion von D-*carba*-dTMP **28** mit anschließender homogener Sequenzabfolge Auswirkungen auf den Wirkmechanismus hat. Dabei stellte sich heraus, dass es nach dem Einbau von D-*carba*-dTMP **28** zu einem sofortigen Abbruch der DNA-Synthese kommt und kein *delayed chain termination* erfolgt. In der sich daran anschließenden Untersuchung mit einer alternierenden Sequenz konnte ergänzend festgestellt werden, dass sich die Sequenzen mit G und C zu A und T unterschiedlich verhalten.

Während in der TATAT-Sequenz ein Abbruch bei n+2 sowie ein Wiedereinsetzen der DNA-Synthese mit letztendlichem Abbruch bei n+4 zu beobachten ist, tolerieren die entsprechenden alternierenden Sequenzen mit C und G zumindest einen einfachen Einbau von D-*carba*-dT-Monophosphat **28** und ermöglichen eine Verlängerung des wachsenden Strangs ohne Abbruch bis n+4.

Obwohl beide Varianten in letzter Konsequenz zum gleichen Resultat führen, bedeutet dies womöglich, dass bei G- und C-haltigen Sequenzen nach Einbau von D-*carba*-dTMP **28** durch die virale Polymerase HIV-RT eher der *delayed chain termination* Wirkmechanismus eintritt. Wenn auf ein Adenosin-Monophosphat (AMP) in der nicht variierten Synthesesequenz ein weiteres Adenosin-Monophosphat folgt, so resultiert im Fall einer darauffolgenden Inkorporation von D-*carba*-dTMP **28** ein Kettenabbruch. Insgesamt betrachtet, entspricht der beobachtete Abbruchmechanismus in den bisher erhaltenen Ergebnissen eher einer *immediate* anstelle einer *delayed chain termination*.

In einer weiteren Studie wurden die beobachteten Einflüsse von G und C in einer randomisierten Sequenz (-AGACA) näher betrachtet. Die dabei erhaltenen Ergebnisse stimmen mit den Resultaten überein, die unter Verwendung der CACAC-Sequenz sowie der GAGAG-Sequenz generiert wurden. In beiden Fällen kann bestätigt werden, dass die alternierende C- respektive G-haltige Sequenz einen Einbau von D-*carba*-dTMP **28** toleriert und die DNA-Synthese dementsprechend jeweils nach einem *delayed chain termination* Wirkmechanismus abbricht.

In einer abschließenden Untersuchung wurde vorausgesetzt, dass die Insertion von D-*carba*-dTMP **28** in den ersten beiden Schritten des Katalysezyklus kaum ein Inhibitionspotential zeigt. Diese Annahme impliziert, dass eine vollständige Elongation des DNA-Strangs erfolgen kann. So wurde nun überprüft, ob neben den bereits beschriebenen Insertionen von D-*carba*-dTMP **28** auf sequentielle Abfolgen auch ein modifizierter Templatstrang Auswirkungen auf die DNA-Synthese zeigt. Dabei kann festgestellt werden, dass nur eine Einfach-Modifikation im Templatstrang, sowohl in Position 26 nt als auch in Position 27 nt, eine Strangverlängerung erlaubt. Allerdings ist in beiden Fällen auch ein DNA-Synthese-Abbruch bei n+4 zu beobachten, wobei die DNA-Synthese zu einem gewissen Anteil wieder einsetzt und den Strang komplettiert.

Wird hingegen ein zweifachmodifizierter Templatstrang (Position 26 nt und 27 nt) der Polymerase zur Verfügung gestellt, so bricht die Elongation des Stranges bei n+4 komplett ab, sodass auch final kein vollständiger Strang erhalten wird. Bei der Gegenüberstellung der Erkenntnisse, resultierend aus den Untersuchungen einer Einfach-Modifikation und einer konsekutiven Zweifach-Modifikation, wird ersichtlich, dass je mehr Modifikationen hintereinander eingebaut werden, desto wahrscheinlicher bricht die DNA-Synthese ab.

In diesem Kontext wurde ebenfalls überprüft, inwieweit die zusätzliche Verfügbarkeit von D-*carba*-dTTP **24** als Substrat einen signifikanten Einfluss auf die Bildung des Gegenstranges eines bereits modifizierten Templatstranges hat. In allen untersuchten Fällen konnte festgestellt werden, dass zunächst die Modifikation im Templatstrang überwunden wird, aber nach der Insertion von D-*carba*-dTMP **28** die DNA-Synthese nach einem *immediate chain termination* Wirkmechanismus abbricht.

Nach Auswertung aller Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass sich der beobachtete Wirkmechanismus unter Verwendung der viralen Polymerase gleichermaßen aus einer *immediate chain termination* und aus einem *delayed chain termination* zusammensetzt.

In A- bzw. T-haltigen Sequenzen ist dabei bevorzugt ein *immediate chain termination* Mechanismus zu beobachten, während bei Sequenzen bestehend aus G und C überwiegend ein *delayed chain termination* Wirkmechanismus festzustellen ist.

6.1.3.4 Co-Kristallisationsstudien mit modifizierten Oligonucleotidsträngen

Um weiterführende Aussagen über den Einfluss der Insertion von D-*carba*-dTMP **28** auf den Wirkmechanismus zu erhalten, wurden in einer Kooperation mit Markus Müller aus der Arbeitsgruppe von Prof. Carell (Universität München) Co-Kristallisationsstudien von DNA/DNA-Komplexen mit modifizierten DNA-Strängen durchgeführt. Wie bereits in Kapitel 4.5 beschrieben, weist dabei der natürliche DNA-Baustein Thymidin eine hohe Strukturähnlichkeit zu D-*carba*-dT **16** auf.^[53]

6.1.3.4.1 Darstellung der DNA/DNA-Komplexe für die Co-Kristallisationsstudien

Bei der DNA-Synthese handelt es sich um einen komplexen biochemischen Vorgang (s. Kapitel 4.7). Neben mehrfach auftretenden Konformationsänderungen während der DNA-Synthese, spielen auch die Affinität sowie die Konformation des einzubauenden Nucleotids eine wichtige Rolle.^[84] Durch Co-Kristallisationsstudien können wichtige Einblicke in den entsprechenden Wirkmechanismus gewonnen werden.

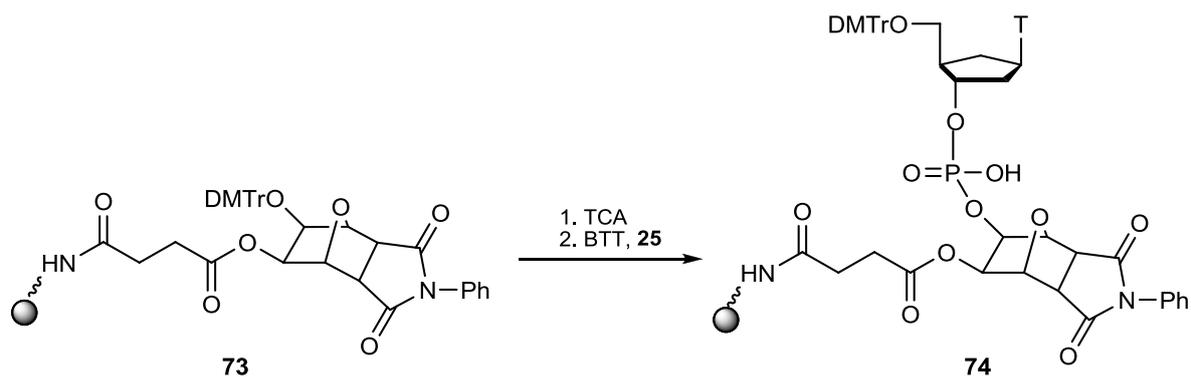


Abbildung 61: Kupplung des UnyLinkers™ **73** an das Phosphoramidit **25**.

Nach erfolgreicher Bindung des Phosphoramidits **25** an die Festphase konnte das etablierte Syntheseprotokoll zur Generierung des Oligonucleotids **71** verwendet werden. Nach Abspaltung der Schutzgruppen sowie Entfernung des Oligonucleotids von der Festphase, wurden die Oligonucleotide mittels RP-HPLC gereinigt.

Die dafür verwendete Methode beruhte auf einem Acetonitril-Gradienten von 0-15% in TEAA-Puffer (pH 7.0) mit einer Dauer von 25 min (bei Raumtemperatur).

Nach erfolgreicher Fraktionierung der jeweiligen Oligonucleotide **71** und **72** mittels der beschriebenen RP-HPLC-Methode, konnten die Chromatogramme der gereinigten Oligonucleotide in einem Reinheitslauf erhalten werden. Abbildung 62 zeigt exemplarisch das Chromatogramm des Reinheitslaufes des Oligonucleotids **71**.

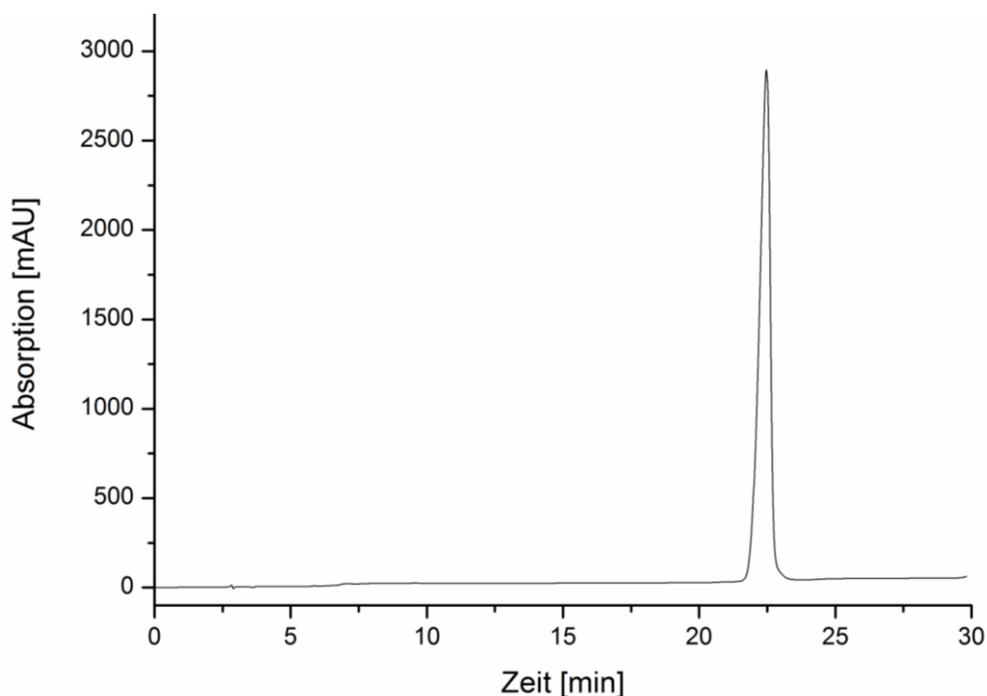


Abbildung 62: HPLC-Chromatogramm des gereinigten Oligonucleotids **71** (Retentionszeit 22.49 min).

Nach der Reinigung wurden die Oligonucleotide **71** und **72** auch massenspektrometrisch charakterisiert, um deren erfolgreiche Synthese zu bestätigen. Exemplarisch ist hierfür in Abbildung 63 das MALDI-Massenspektrum des Oligonucleotids **71** mit $M (m/z) = 3953.041 [M-H]^{1-}$ gezeigt.

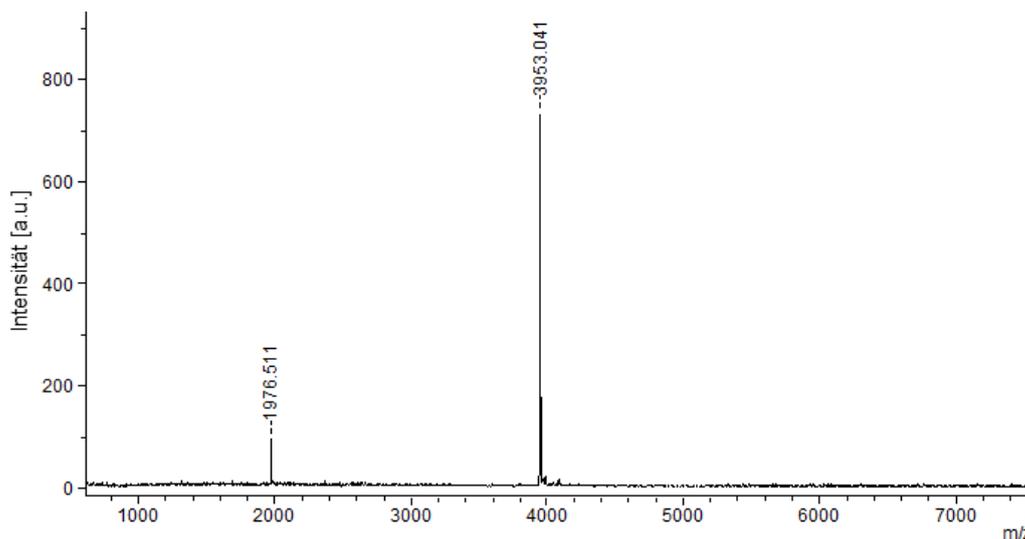


Abbildung 63: Darstellung des MALDI-TOF Massenspektrums des gereinigten Oligonucleotids **71**.

Um die Oligonucleotide **71** und **72** kristallographisch darzustellen, schloss sich der Synthese der genannten Oligonucleotide deren Hybridisierung zu den entsprechenden DNA/DNA-Komplexen **69** und **70** an. Dazu wurden die Oligonucleotide **71** und **72** jeweils mit dem Hybridisierungspuffer (Kapitel 7.1.5.1) für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend über drei Stunden langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

In der Folge wurde das Enzym Polymerase I aus *Geobacillus stearothermophilus* (BstPOLI), genauer deren Klenow-Fragment, als Protein für die Kristallisationsansätze verwendet. Dieses gut zu kristallisierende Protein wird häufig als Stützstruktur eingesetzt, um einen guten ersten Einblick in das Verhalten modifizierter DNA-Stränge zu erhalten.^[111]

Für den DNA/DNA-Komplex **69** und seine unmodifizierte Form konnten Kristalle in den Protein-DNA-Kristallisationsansätzen erhalten werden. Mit Hilfe dieser Kristalle gelang es schließlich, mittels Röntgenbeugungsmessungen wertvolle Datensätze zur Interpretation des Wirkmechanismus in einer Auflösung von 2.1 Ångström zu generieren.

In Abbildung 64 sind die überlagerten Kristallstrukturen des modifizierten und unmodifizierten Protein-DNA-Komplexes abgebildet. Der rote Kreis markiert das aktive Zentrum der Polymerase, in welchem sich das letzte Basenpaar A:T (grün unterlegt) sowie A:T* (orange unterlegt) befindet.

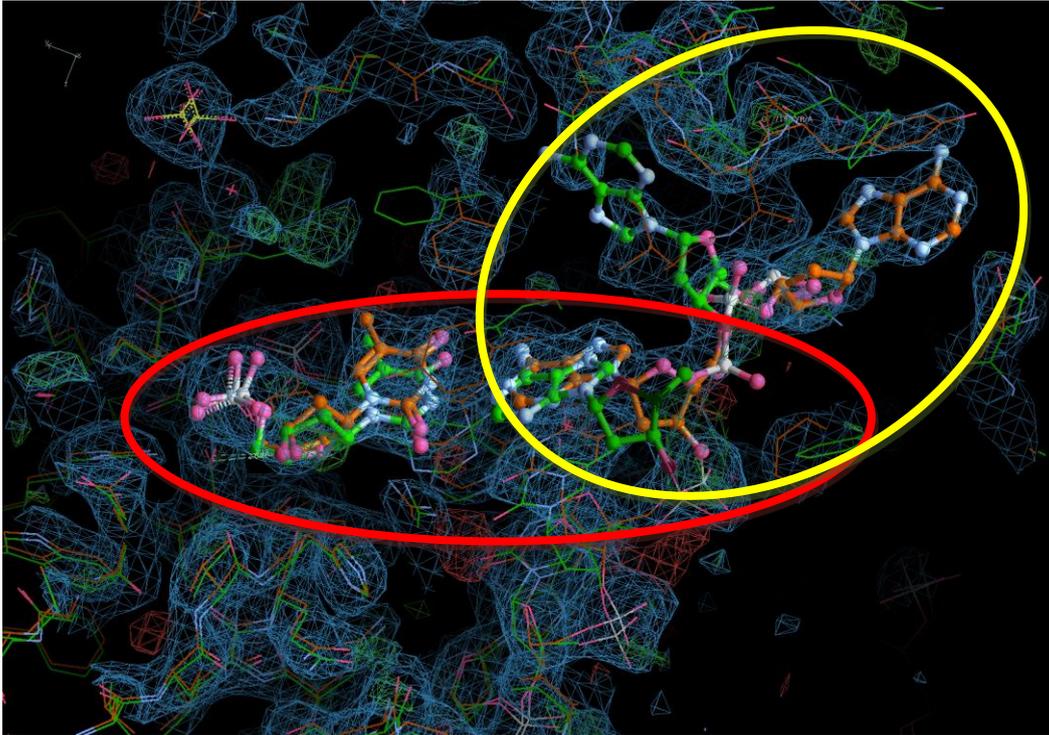


Abbildung 64: Erhaltene Darstellung des unmodifizierten sowie modifizierten DNA/DNA-Duplexes **69** aus den Co-Kristallisationsuntersuchungen.

In der linken Hälfte des roten Kreises ist das „TMP“ (Thymidin-Monophosphat; grün) bzw. „T*MP“ (D-*carba*-dTMP **28**; orange) überlagert dargestellt. In Analogie zu den Ergebnissen von BOYER bestätigt auch die Auswertung der Abbildung 64 die starke Strukturähnlichkeit von Thymidin und D-*carba*-dT **16**.^[53]

In beiden Fällen („TMP“ und „T*MP“) scheint die räumliche Anordnung der entsprechenden Nucleobasen nahezu identisch zu sein, sodass es zur Ausbildung der essentiellen Watson-Crick-Basenpaarung mit dem komplementären AMP kommen kann. Auch die für den weiteren DNA-Syntheseprozess wichtige Orientierung der 3'-Hydroxylgruppe, zur Erkennung und Einführung des nächsten Nucleotids, zeigt auf den ersten Blick eine starke Ähnlichkeit. Nach genauerer Auswertung wird jedoch deutlich, dass die 3'-Hydroxylgruppe von D-*carba*-dT-Monophosphat **28** ca. 0.5 Ångström weiter von der Aminosäure Asp 830 entfernt ist als das natürliche Substrat. Diese leichte Abweichung in der Orientierung kann dazu führen, dass die zum Einbau des nächsten Nucleotids benachbarten Wechselwirkungen nicht mehr in dem benötigten Umfang gegeben sind, wodurch die DNA-Synthese nach einem *immediate chain termination* Wirkmechanismus abbricht.^[112]

Obwohl „TMP“ (grün) und „T*MP“ (orange) eine ähnliche Konformation im aktiven Zentrum der Polymerase aufweisen, zeigen sich bei den komplementären AMP's wesentliche strukturelle Unterschiede. Aus der Lage des grün unterlegten AMP (Basenpaar zu TMP) und des orange unterlegten A (Basenpaar zu T*) wird ersichtlich, inwieweit die nachfolgenden Nucleotide im Templatstrang beeinflusst werden.

Kleine Unterschiede in der räumlichen Ordnung zwischen AMP:TMP und AMP:T*MP reichen demnach aus, um eine geschlossene oder offene *pre insertion site* aufzuweisen (oberer gelber Kreis). Dabei übt die Basenpaarung AMP:T*MP solch einen starken Einfluss auf das System aus, dass das nächste einzubauende Nucleotid sich nicht in der *pre insertion site* orientiert, sondern räumlich abgewandt vorliegt (orange unterlegt). Aus diesen Erkenntnissen wird deutlich, dass die Inhibierung der DNA-Synthese vermutlich durch einen *immediate chain termination* Wirkmechanismus verursacht wird.

Eine geschlossene *pre insertion site* ist das Resultat eines komplexen Vorganges während der DNA-Synthese.^[113] In zahlreichen strukturellen Untersuchungen konnten neben der *pre insertion site* von Protein-DNA-Komplexen weitere strukturell sowie mechanistisch wichtige Merkmale identifiziert werden, die zu einer akkuraten DNA-Synthese beitragen. Als eingängiges Beispiel soll hier das Modell anhand des verwendeten Enzyms BstPOLI diskutiert werden.^[113]

Abbildung 65 ist zu entnehmen, dass sich in der *pre insertion site* das nächste Nucleotid (blauer Kreis) aus dem Templatstrang für die DNA-Synthese befindet. Die notwendige Verschiebung des Nucleotids von dem Templatstrang in die *insertion site* geht mit einer Änderung von einer offenen in eine geschlossene Konformation einher. In der *insertion site* erfolgt der kanonische Einbau eines dNTPs komplementär zu dem entsprechenden Nucleotid aus dem Templatstrang (entspricht der n-Position, grüner Kreis, Abbildung 65).

Nach dem Einbau wird das neu zusammengefügte Basenpaar in die *post insertion site* geschoben, wodurch ein Basenpaar aus der DNA *duplex binding region* (n-5 Position) freigegeben wird. Währenddessen erfolgt eine Änderung von der geschlossenen in die offene Konformation. Dadurch kann das nächste Nucleotid aus dem Templatstrang in die *pre insertion site* gelangen und die Katalyse der DNA-Synthese fortgesetzt werden.^[113]

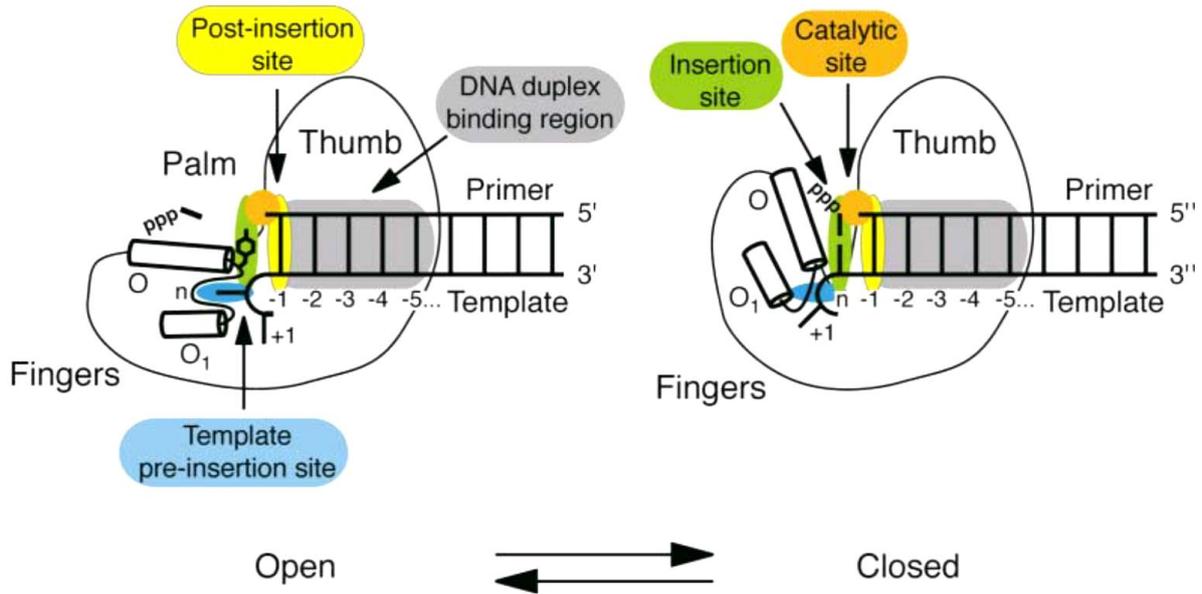


Abbildung 65: Schematische Darstellung der Konformationsänderung der *insertion site* am Beispiel des *Bacillus* DNA Polymerase I Fragmentes.^[113]

Aus Untersuchungen von BEESE geht hervor, dass eine geschlossene *pre insertion site* u.a. durch eine Fehlpaarung von z.B. GMP:TMP (Primer/Templat) verursacht wird (Abbildung 66).^[113] Bei einem Fehleinbau von GMP in den wachsenden DNA-Strang nimmt GMP eine ähnliche kanonische Konformation wie AMP ein. Folglich bleibt die wichtige Orientierung der 3'-Hydroxylfunktion von G für die DNA-Synthese im katalytischen Zentrum erhalten. Allerdings ändert sich die Position des Templatnucleotids TMP geringfügig. In der *post insertion site* führt dies schließlich zur Lageänderung des Templats, wodurch die Aminosäure anstatt mit dem Templatstrang mit dem *mismatch* GMP im Primerstrang wechselwirkt.^[113]

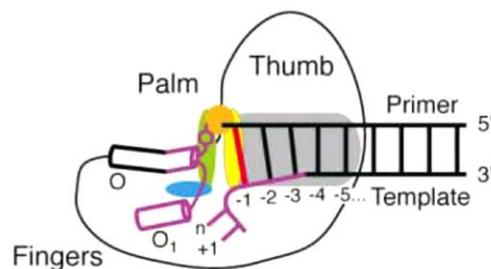


Abbildung 66: Schematische Darstellung der geschlossenen *pre insertion site*.^[113]

Bei der Übertragung dieser Erkenntnisse auf die HIV-RT können vergleichbare Vorgänge in der *post insertion site* an den Positionen n-1 bis n-5 ablaufen, sobald das Monophosphat **28** eingebaut wurde.^[114] Unter der Annahme, dass der Einbau des D-*carba*-dTMPs **28** erst in Position n-2 einen wesentlichen Einfluss auf die ablaufende DNA-Synthese hat, könnte der Wirkmechanismus erklärt werden. Diese Erkenntnisse stimmen mit den Resultaten aus den *primer extension assays* überein und unterstützen die These, dass der Einbau von **28** in den Primerstrang in der *post insertion site* der HIV-RT einen wesentlichen Einfluss auf die räumliche Orientierung der Nucleotide C/G und A/T im Templatstrang (Position n-1) und demzufolge auf die DNA-Synthese hat. Auch die geringfügig veränderte Orientierung der 3'-Hydroxylgruppe von D-*carba*-dTMP **28** scheint ein zentraler Faktor im Wirkmechanismus zu sein, da die nötigen Wechselwirkungen, beispielsweise zu der Aminosäure Asp 830, ausbleiben scheinen. Daraus folgt, dass die veränderte Orientierung einen relevanten Einfluss auf den Abbruchmechanismus nimmt.

6.1.3.5 Studien mit dem Triphosphat des carbocyclischen Nucleosids **24** unter Verwendung der humanen DNA-Polymerasen β und γ

Wie bereits in Kapitel 4.3 beschrieben, wurden in der Vergangenheit kontroverse Daten bezüglich der Toxizität von D-*carba*-dTTP **24** erhalten. Neben einer vielversprechenden antiviralen Aktivität zeigte das Triphosphat **24** jedoch laut BÉRES eine hohe Cytotoxizität, die sich im Nachhinein als inkorrekt erwies.^[115] Die von BÉRES berichtete Toxizität ist wahrscheinlich auf die in der Synthese verwendeten Chemikalien zurückzuführen. Eine weitere Überprüfung im Jahre 2006 durch OLAF LUDEK konnte die antiviralen Eigenschaften von D-*carba*-dT **16** bestätigen, nicht aber deren Cytotoxizität.^[100] Im Jahre 2015 gelang es TRISTAN GOLLNEST das carbocyclische Nucleosid **16** als TriPPPro-Verbindung darzustellen, welche Prof. SCHOLS von der Universität Leuven (Belgien) bezüglich seiner Aktivität und Toxizität untersuchte.^[73,74,75]

Die antivirale Aktivität konnte auch in diesen Tests bestätigt werden. Zudem gelang es, die Zellgängigkeit der TriPPPro-Verbindungen nachzuweisen, die sich jedoch vermutlich negativ auf die Cytotoxizitätswerte der Verbindung auswirkte, aufgrund der resultierenden, hohen intrazellulären Triphosphatkonzentration. Bereits 1966 konnte festgestellt werden, dass eine zu hohe Thymidintriphosphat-Konzentration in der Zelle einen inhibitorischen Effekt auf den Stoffwechsel ausübt, woraus hohe Cytotoxizitätswerte resultieren.^[116] Diese These wurde durch die Untersuchung eines TriPPPro-Prodrugs des natürlichen Thymidins gestützt, das ebenfalls sehr hohe Cytotoxizitätswerte aufwies.^[73]

Da *D-carba*-dT **16** ein Analogon des natürlichen DNA-Bausteins Thymidin darstellt, kann davon ausgegangen werden, dass der hohe Toxizitätswert aus der *TriPPP*o-Verbindung mit dem carbocyclischen Nucleosid **16** aus der strukturellen Ähnlichkeit resultiert.

Aufgrund der nicht eindeutigen Resultate der vorangegangenen Studien sollten im Rahmen dieser Arbeit Toxizitäts-Studien mittels *primer extension assays* durchgeführt werden. Für diese Studien wurden die humanen DNA-Polymerasen β und γ ausgewählt, die beide essentielle Aufgaben in der Replikation von Zellen übernehmen.

6.1.3.5.1 *Primer extension assays* mit der humanen DNA-Polymerase β

Die humane DNA-Polymerase β ist eine zelluläre Reparatur-Polymerase und gehört zu der Familie X.^[117] Diese Polymerase besitzt keine 3'-5'-Exonucleasefunktion und repliziert DNA *in vitro* mit einer hohen Fehlerrate von 10^{-4} Basenpaaren.^[118] *In vivo* wird die hohe Fehlerrate während der DNA-Replikation durch einen BER-Protein-Komplex sowie die Korrekturlesefunktion externer 3'-5'-Exonucleasen vermindert.^[119]

In der Abbildung 67 sind zwei untersuchte Sequenzen mit den dazugehörigen Autoradiogrammen aus den *primer extension assays* gezeigt. Abermals sind die Referenzproben („-“, „+“) mit aufgeführt. Wie der Zusammensetzung des Analyseansatzes zu entnehmen ist, wäre eine vollständige Elongation des DNA Stranges aufgrund der zur Verfügung stehenden Basen in der Probe „N*“ (A, C, G, T*) denkbar – allerdings nur unter der Voraussetzung, dass die Polymerase das Triphosphat *D-carba*-dTTP **24** als gleichwertigen DNA-Baustein erkennt und entsprechend die DNA-Synthese nicht vorzeitig terminiert.

Jedoch scheint *D-carba*-dTTP **24** ein sehr schlechtes Substrat für die humane DNA-Polymerase β darzustellen, da es in der DNA-Synthese nur geringfügig zur Bildung des n+1-Primers eingebaut werden kann. Dem linken Autoradiogramm der Abbildung 67 ist des Weiteren zu entnehmen, dass nach dem marginalen Einbau von *D-carba*-dTMP **28** keine weitere Strangverlängerung erfolgt. Analoge Ergebnisse sind auch für die entsprechenden Proben „A, T*“ und „T*“ zu beobachten.

Aus dem Autoradiogramm auf der rechten Seite gehen ähnliche Resultate hervor. Diesem Reaktionsansatz ist wiederum ein *running start* System zu Grunde gelegt (vgl. Kap. 6.1.3.3.2). Dementsprechend ist in den Proben „N*“ und „A, T*“ erst der natürliche kanonische Einbau von AMP zu n+1 (= 26 nt) zu beobachten. Anschließend sollte nun der Einbau der Modifikation D-*carba*-dTMP **28** durch die humane Polymerase β zu n+2 erfolgen, der auch tatsächlich zu einem größeren Prozentsatz erfolgt. Allerdings bricht die DNA-Synthese nach der Insertion, einem *immediate chain termination* Mechanismus folgend, ab. Dies lässt darauf schließen, dass das Triphosphat **24** von der humanen DNA-Polymerase β zwar als Substrat erkannt wird, jedoch die strukturellen Eigenschaften von D-*carba*-dTMP **28** nach der Insertion eine weitere Verlängerung des DNA-Stranges unterbinden.

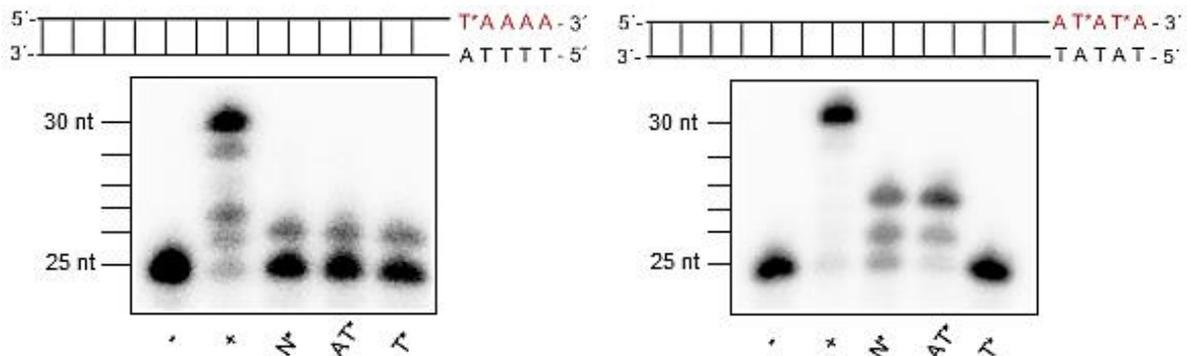


Abbildung 67: Autoradiogramme der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese der Reaktionen mit der humanen DNA-Polymerase β .

Im Folgenden wird erneut die Annahme getroffen, dass D-*carba*-dTTP **24** ein gutes Substrat für die Polymerase β darstellt, weshalb eine komplette Verlängerung des Stranges möglich sein sollte. Aus diesem Grund erfolgte die Überprüfung des Einflusses von dem Monophosphat **28** in einem Templatstrang. Für diese Untersuchungen wurden wiederum die synthetisierten (modifizierten) Oligonucleotide **53**, **54** und **55** genutzt.

In den durchgeführten Experimenten sollten die natürlichen Substrate in bereits modifizierte DNA-Stränge eingebaut werden. Die Autoradiogramme in Abbildung 68 visualisieren die Resultate der *primer extension assays* mit den Oligonucleotiden **53** und **54** als Templatstrang. Bei Betrachtung des linken Autoradiogramms ist ersichtlich, dass bei der Verwendung des hier untersuchten DNA/DNA-Komplexes des Oligonucleotids **53** als Templatstrang, vermutlich aufgrund der beinhalteten einfachen Modifikation an der Position n+1 im Templatstrang, kein Umsatz zu n+5 in der Probe „N“ erfolgt.

Es kann damit gezeigt werden, dass das Monophosphat **28** im Templatstrang **53** eine *immediate chain termination* verursacht und somit einen Effekt auf die DNA-Synthese ausübt. In den übrigen Proben („C“, „G“, „T“) kann keine nicht-kanonische Insertion beobachtet werden.

Wird nun das rechte Autoradiogramm der Abbildung 68 betrachtet, so wird ersichtlich, dass in dem DNA/DNA-Komplex mit der Oligonucleotidsequenz **54**, trotz der lediglich einfachen Modifikation an der Position n+2, eine nur unzureichende Strangverlängerung bis n+4 zu erkennen ist.

Das bedeutet, dass die Modifikation an der Stelle n+2 im Templatstrang (Abbildung 68, rechte Seite) etwas besser von der humanen DNA-Polymerase β toleriert wird, als an Position n+1 (linke Seite). Allerdings bricht die DNA-Synthese nach dem Einbau bei n+2 größtenteils ab und wird nur zu einem kleinem Prozentsatz weiter zu n+4 umgesetzt.

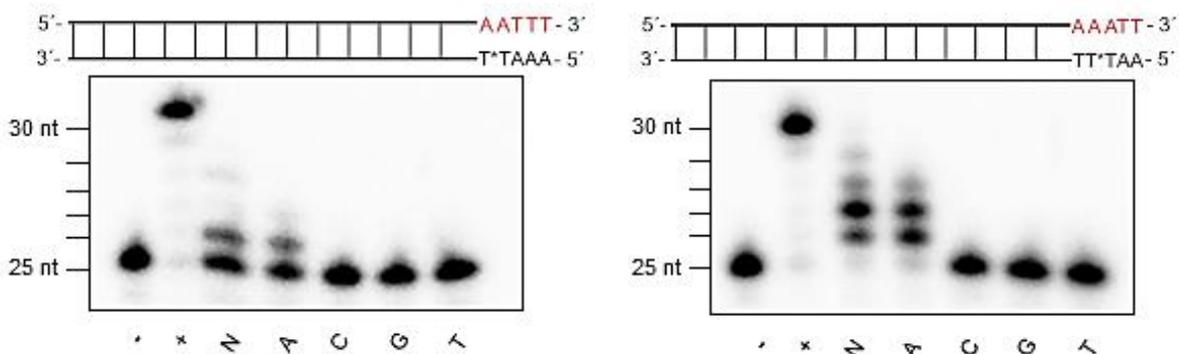


Abbildung 68: Autoradiogramme der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese zur Untersuchung des Einflusses von dem Monophosphat **28** an den entsprechenden Positionen (humane DNA-Polymerase β).

6.1.3.5.2 *Primer extension assays* mit der humanen DNA-Polymerase γ

Neben der humanen DNA-Polymerase β nimmt auch die humane DNA-Polymerase γ eine zentrale Rolle in unserem Zellsystem ein. Die humane DNA-Polymerase γ ist die einzig bekannte humane DNA-Polymerase in den Mitochondrien.^[78,120] Die Hauptaufgaben dieses Enzyms sind die mitochondriale DNA-Replikation sowie die Reparatur der entsprechenden DNA. Die Polymerase besitzt eine endogene 3'-5'-Exonucleasfunktion, die für den *base excision repair* benötigt wird.^[78,120] Bei einer defekten mtDNA kommen u.a. diese Mechanismen zum Einsatz, da sonst mitunter eine mitochondriale Disfunktion eintreten kann, welche sich beispielsweise in Form von Krankheiten wie Myopathie zeigt.^[78,120]

Analog zu den bereits beschriebenen Studien mit der humanen DNA-Polymerase β , wurden entsprechende Untersuchungen mit der humanen DNA-Polymerase γ durchgeführt (siehe Kapitel 6.1.3.5.1).

In Abbildung 69 sind die beiden untersuchten Sequenzen mit den jeweils erhaltenen Autoradiogrammen der *primer extension assays* abgebildet. Wie aus der Zusammensetzung des Analysenansatzes aus Abbildung 69 (linke Seite) erkennbar ist, könnte in der Probe „N*“, unter der Voraussetzung, dass sich D-*carba*-dTTP **24** wie ein gleichwertiger DNA-Baustein verhält, eine vollständige Elongation des DNA-Stranges erfolgen. Jedoch scheint das Triphosphat **24** ein sehr schlechtes Substrat für die Polymerase γ zu sein, sodass es nur geringfügig in den wachsenden Strang eingebaut wird.

Bedingt durch den marginalen Einbau von D-*carba*-dTMP **28** in den DNA-Strang, ist keine weitere Strangverlängerung festzustellen. Analoge Ergebnisse können auch für die entsprechenden Proben „A, T*“ und „T*“ beobachtet werden.

Das rechte Autoradiogramm der entsprechenden Abbildung zeigt ähnliche Resultate. Bei diesem Reaktionsansatz sollte das Monophosphat **24** erst an der Position n+2 eingebaut werden. Dementsprechend zeigt sich zunächst in den Proben „N*“ und „AT*“ der natürliche kanonische Einbau von A zu n+1. Nach der erfolgten Insertion hätte nun der Einbau von D-*carba*-dTMP **28** stattfinden sollen. Doch wie aus dem entsprechenden Autoradiogramm ersichtlich, nimmt die humane DNA-Polymerase γ keinen Einbau des Monophosphats **28** vor. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die humane DNA-Polymerase γ das unnatürliche Nucleotid D-*carba*-dTTP **24** nur sehr unzureichend als Substrat erkennt.

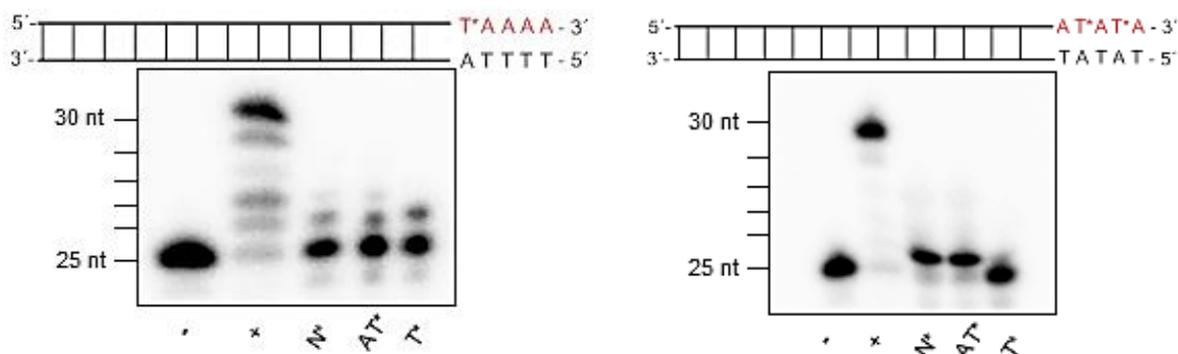


Abbildung 69: Autoradiogramme der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese der Reaktionen mit der humanen DNA-Polymerase γ .

Es galt nun zu prüfen, wie sich die humane DNA-Polymerase γ bei Anwesenheit von D-*carba*-dTMP **28** im Templatstrang verhält. Unter der Annahme, dass die Polymerase γ das Monophosphat **28** als eine natürliche Base erkennt, sollte eine komplette Verlängerung des Stranges erfolgen. Aus diesem Grund wurde zusätzlich überprüft, welchen Einfluss das D-*carba*-dTMP **28** in einem Templatstrang auf die DNA-Synthese hat. Für diese Studie wurden wiederum die synthetisierten Oligonucleotide **53** und **54** genutzt.

Analog zu den vorherigen Experimenten musste zunächst die Polymerase γ die Modifikation im Templatstrang überwinden. Im ersten Reaktionsansatz (Abbildung 70, linke Seite) wurde das Oligonucleotid **53** verwendet. Hier wird ersichtlich, dass in den untersuchten DNA/DNA-Komplexen aufgrund der einfachen Modifikation im Templatstrang an der Position n+1 in der Probe „N“ auch in diesem Fall kein Umsatz zu n+5 erfolgt. Allerdings zeigt sich in der Probe „N*“ ein Strangabbruch bei n+3, der vom carbocyclischen Nucleotidanalogue im Templatstrang herrühren muss. Aufgrund des „verspäteten“ Auftretens dieses Abbruches wird deutlich, dass er einer *delayed chain termination* folgt. Die Auftrennung der Probe „A“ lässt, wie erwartet, den zweifachen kanonischen Einbau zu erkennen. In den übrigen Proben („C“, „G“, „T“) können erwartungsgemäß keine Insertionen beobachtet werden.

Wird nun das rechte Autoradiogramm (Abbildung 70) betrachtet, wird deutlich, dass in dem DNA/DNA-Komplex mit der Oligonucleotidsequenz **54**, wegen der lediglich einfachen Modifikation an der Position n+2, eine Strangverlängerung bis n+3 (Proben „N“ und „A“) zu erkennen ist. Das bedeutet, dass die Modifikation an der Stelle n+2 im Templatstrang im ähnlichen Maße von der humanen DNA-Polymerase γ toleriert wird, wie auch die Modifikation an Position n+1 (Abbildung 70, linke Seite). Allerdings bricht die DNA-Synthese nach dem Einbau bei n+3 ab, sodass kein vollständiger Strang erhalten wird. Wie aufgrund der Basenabfolge des Templatstrangs zu erwarten war, ist in den weiteren Proben kein Einbau zu erkennen.

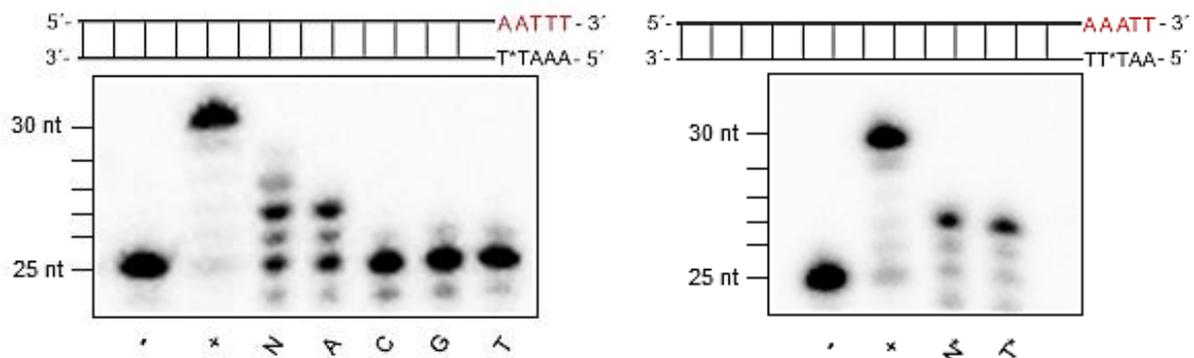


Abbildung 70: Autoradiogramme der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese zur Untersuchung des Einflusses des Monophosphats **28** an den entsprechenden Positionen (humane DNA-Polymerase γ).

Die durchgeführten Untersuchungen belegen ein unterschiedliches Verhalten der getesteten humanen DNA-Polymerase β und γ bezüglich der Substrataffinität zu *D-carba*-dTTP **24**. Während das Triphosphat **24** ein für die humane DNA-Polymerase β akzeptables Substrat darstellt, so wird es von der humanen DNA-Polymerase γ als schlechtes Substrat erkannt.

Obwohl das *D-carba*-dTMP **28** den Elongationsprozess jeweils unterschiedlich beeinflusst, wird in der Summe in keinem der vorliegenden Fälle eine vollständige Elongation des DNA-Stranges erzielt.

Unter Verwendung der bereits modifizierten Oligonucleotide **53** und **54** in den jeweiligen Templatsträngen der DNA/DNA-Komplexe, verhalten sich die beiden Polymerasen ähnlich. Die DNA-Polymerase β ist in der Lage den kanonischen Einbau gegenüber der Modifikation **28** im Templatstrang zu realisieren, bevor es zum Abbruch der DNA Synthese kommt. Im Vergleich dazu toleriert die humane DNA-Polymerase γ zwar auch den zur carbocyclischen Modifikation **28** kanonischen Einbau, baut jedoch noch ein weiteres Nucleotid in den wachsenden Strang ein, bevor die DNA-Synthese auch hier zum Erliegen kommt.

Da in den durchgeführten Untersuchungen festgestellt wurde, dass das Analogon *D-carba*-dTTP **24** ein mögliches Substrat für die humanen DNA-Polymerasen β und γ ist und nicht ausgeschlossen werden kann, dass von dem Triphosphat **24** tatsächlich eine Cytotoxizität ausgeht, sollten in fortführenden Untersuchungen weitere toxikologische Daten gewonnen werden.

6.2 Entwicklung neuartiger Nucleosidtriphosphat-Prodrugs

Ein Schwerpunkt der antiviralen Therapie ist die Inhibierung der DNA- bzw. RNA-Synthese der viralen Polymerasen, wie z.B. der HIV-Reverse Transkriptase, durch Verwendung von Nucleosidanaloga als sogenannte RT-Inhibitoren.^[71]

Zurzeit kommen dabei hauptsächlich Analoga zum Einsatz, die an der 3'-Position keine Hydroxylfunktion aufweisen.^[11] Dieses Strukturelement ist unabdingbar für eine Replikation oder einem Aufbau von DNA bzw. RNA. Die Inkorporation von Nucleosidanaloga ohne 3'-Hydroxylgruppe führt umgehend zu einem Abbruch der DNA-Synthese, da an den eingebauten Analoga keine weitere Phosphatdiesterbindung für die Strangverlängerung gebildet werden kann (Kapitel 3, Abbildung 1). Als nachteilig hat sich beim Einsatz dieser Nucleosidanaloga allerdings herausgestellt, dass diese aufgrund der Substratspezifität der intrazellulären Kinasen häufig nur unzureichend zum biologisch aktiven Triphosphat metabolisiert werden, wodurch die Effizienz dieser Verbindungen teilweise stark limitiert ist.^[53,121] Eine direkte Verabreichung der Nucleosidtriphosphate wäre wünschenswert, ist jedoch nicht realisierbar, da diese aufgrund ihrer hohen Polarität keine Zellmembrangängigkeit aufweisen. Allerdings gelang es TRISTAN GOLLNEST, das erste Triphosphat-Prodrug-Konzept zu etablieren, welches die direkte Freisetzung des biologisch aktiven Nucleosidtriphosphats in der Zelle ermöglicht.^[73,74,75]

In dieser Arbeit sollte ein weiterer Beitrag zur Optimierung dieses vielversprechenden Konzepts geleistet werden. Dabei galt es, sich im Besonderen auf zwei grundlegende Probleme der Nucleosidtriphosphate zu fokussieren, die auf natürlichen Prozessen basieren:

- (Teilweise) sehr schnelle Dephosphorylierung der Triphosphate von Nucleosidanaloga
- Differenzierung der Substratspezifität zwischen viralen und zellulären Polymerasen

In der viralen DNA-Synthese kann das entsprechende NRTI, aufgrund der fehlenden Korrekturlesefunktion der HIV-RT, nach dessen Inkorporation nicht mehr entfernt werden. Infolgedessen wird die genetische Information des Virus unvollständig dargestellt, was dazu führt, dass diese von wirtseigenen Mechanismen erkannt und eliminiert wird. Dahingegen können die humanen DNA-Polymerasen durch das Vorhandensein einer internen oder externen Korrekturlesefunktion die Analoga in der zelleigenen DNA erkennen: es erfolgt eine Eliminierung der Analoga, die jedoch nicht vollständig verläuft.^[77,87,88] Des Weiteren können trotz dieser Korrekturlesefunktionen Cytotoxizitäten auftreten, da die entfernten Analoga gegebenenfalls im Zellsystem verbleiben und aufgrund dessen potentiell biochemische Prozesse negativ beeinflussen können.

Im Allgemeinen weisen DNA-Polymerasen eine intrinsische Fehlerrate in einem Bereich von 10^{-3} bis 10^{-5} auf, während beispielweise die HIV-RT eine deutlich größere Fehlerrate besitzt.^[86,87,122] Zudem zeichnen sich die humanen DNA-Polymerasen durch eine höhere Substratspezifität aus. Diese ist begründet auf der recht geringen strukturellen Flexibilität humaner DNA-Polymerasen, auch im aktiven Zentrum des Enzyms. Aus dieser Inflexibilität folgt, dass lediglich „passgenaue“ Verbindungen als Substrate der humanen DNA-Polymerasen dienen können. Im Vergleich zu den humanen DNA-Polymerasen besitzen die viralen Polymerasen, wie die HIV-RT, eine deutlich höhere Flexibilität im aktiven Zentrum. Dies hat zur Folge, dass die virale Polymerase auch Substrate als solche akzeptiert, die nicht zwingend kongruent zur Struktur des aktiven Zentrums sind, was die geringere Substratspezifität dieser Enzyme begründet.^[123]

Fällt die Selektivität der humanen DNA-Polymerasen ebenfalls gering aus, können die NRTI in die wirtszelleigene DNA eingebaut werden, dort verbleiben und als Folge zu schwerwiegenden toxischen Nebenwirkungen führen: Erstmals konnte durch DALAKAS im Jahr 1990 bei Patienten in der HIV-Therapie eine AZT-induzierte mitochondriale Myopathie beobachtet werden.^[124] Darauf folgende Untersuchungen bestätigten, dass die beobachtete mitochondriale Toxizität auf der Beteiligung der humanen DNA-Polymerase γ beruht.^[125]

Es ließ sich jedoch nicht ausschließlich für AZT **1**, sondern auch für andere, auf nucleosidischen Analoga beruhende und für die HIV-Therapie zugelassene Wirkstoffe eine mitochondriale Toxizität nachweisen. In kinetischen Studien mit der humanen DNA-Polymerase γ konnte *in vitro* eine Hierarchie der Toxizität für einige NRTI erstellt werden: ddC \geq d4T \gg 3TC $>$ AZT $>$ CBV.^[125]

In der Vergangenheit haben sich verschiedene *primer extension assays* als geeignete Analysemethoden herausgestellt, um eventuelle Toxizitäten von NRTI im Vorwege zu ermitteln. So zeigte sich in *polymerase assays*, dass ddC-TP ein besseres Substrat für die humane DNA-Polymerase γ darstellt, als AZT-TP **75** oder CBV-TP **76**. Das Nucleotid ddC-TP **77** ist hierbei sogar ein genauso gutes Substrat wie die natürlichen Nucleotide.^[125] Da es sich bei der verwendeten Polymerase um eine humane DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion handelt, wurde zunächst davon ausgegangen, dass die Nucleosidanaloga durch die intrinsische Exonuclease-Aktivität der humanen DNA-Polymerase γ eigentlich wieder entfernt werden würden. Allerdings konnte LIM im Jahre 2001 zeigen, dass die Entfernung der NRTI sehr ineffizient abläuft, wodurch die Analoga auch *in vivo* im System verbleiben und letztendlich toxische Effekte hervorrufen können.^[126]

Generell können nicht nur die Triphosphate der Nucleosidanaloga toxische Effekte hervorrufen, sondern bereits deren Metabolite, die u.a. während der Phosphorylierungskaskade des entsprechenden Nucleosids entstehen. So ist beispielsweise bekannt, dass von AZT-Monophosphat (AZT-MP) **78** eine Toxizität ausgeht.^[127]

Dieser Effekt wird dadurch verstärkt, dass die Umsetzung von AZT-MP **78** zum AZT-DP **79** durch die Thymidylatkinase (TMPK) kinetisch gehemmt ist (Abbildung 71).^[26]

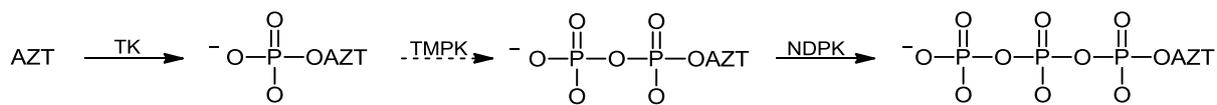


Abbildung 71: Schematische Darstellung der Umsetzung von AZT zum entsprechenden Triphosphat. Die Reaktion zum Nucleosiddiphosphat stellt den beschriebenen Flaschenhals dar.

Die unzureichende Bildung des Nucleosiddiphosphats führt zu einer intrazellulären Akkumulation von AZT-MP **78**, welches unter anderem für die Inhibierung von zellulären 3'-Exonucleasen verantwortlich ist.^[127] Daher gelten Nucleosidanaloga sowie deren Metabolite stets als potentielle Mutagene.

6.2.1 Die Bestätigung des BAB-TriPPPro-Konzeptes

Aufbauend auf den Ergebnissen von TILMANN SCHULZ war es TRISTAN GOLLNEST gelungen, das sogenannte Bis(acyloxybenzyl)-Nucleosidtriphosphat-Prodrug-Konzept (BAB-TriPPPro-Konzept) als erstes effektives Triphosphat-Prodrugsystem zu entwickeln. Dieses Konzept ermöglicht die direkte Freisetzung des biologisch aktiven Triphosphat-Wirkstoffs im Zellmedium.^[73,74,75]

Grundlage ist die doppelte Maskierung der γ -Phosphateinheit, wodurch eine ausreichende Lipophilie erzielt werden kann, um eine passive Diffusion der dreifach phosphorylierten Verbindung durch die lipophile Zellmembran zu ermöglichen. Durch die enzymatische Demaskierung mittels unspezifischer Esterasen und Lipasen wird im Zellinneren schließlich das Triphosphat freisetzt (siehe Kapitel 4.6, Abbildung 17). Mit diesem Konzept können erstmalig alle enzymatischen Phosphorylierungsschritte vom Nucleosid bis hin zum Triphosphat vollständig umgangen werden, wodurch mögliche Limitierungen ausgehend von der Substratspezifität der beteiligten Kinasen ausgeschlossen werden.^[73,74,75]

Um die enzymatische Freisetzung der Triphosphatform aus einer TriPPPro-Verbindung mit Hilfe einer biochemischen Analyse- und Verifizierungsmethode zu verifizieren, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit *primer extension assays* zur Beweisführung genutzt werden. Dafür wurden nach Hydrolyse der TriPPPro-Verbindungen durch Schweineleberesterase das entsprechende Triphosphat isoliert und mit dieser isolierten Verbindung *primer extension assays* durchgeführt (Abbildung 72).^[73,74]

Analog zu den Untersuchungen in Kapitel 6.1 wurde für die Studien ein ^{32}P -markierter Primer (25 nt) verwendet, welcher vorher mit einem komplementären Oligonucleotid (30 nt) hybridisiert wurde.

Zunächst wurde die *primer extension assays* das Substrat d4TTP **80** zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe eines *standing-start*-Ansatzes sollte d4TMP **81** an der Position n+1 in den wachsenden Strang eingebaut werden. Das linke Autoradiogramm der Abbildung 72 zeigt die Probe „N“, in deren Primer-Verlängerungsstudie der Polymerase die Triphosphate von A, C und G sowie d4TTP **80** bereitgestellt wurden, wobei sich erwartungsgemäß ein Abbruch der DNA-Synthese nach Insertion von d4TMP **81** zeigt. Aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylfunktion des verwendeten Analogons ist die Verlängerung des DNA-Stranges nicht mehr möglich. Auch in den übrigen Proben wie „T“, C, G“ oder „T“ ist ein zur Probe „N“ analoges Ergebnis deutlich zu erkennen.^[73,74]

Ein konsistentes Ergebnis kann auch bei dem zweiten Ansatz (Abbildung 72, rechts) mit dem natürlichen Thymidintriphosphat erhalten werden.^[73,74] Hier in dem *standing-start*-Ansatz sollte das aus der Hydrolyse der TriPPP-Pro-Verbindung gewonnene TTP **82** als Substrat dienen. Die Abbildung 72, (rechte Seite) zeigt für die Probe „N*“ die erfolgreiche Elongation des Stranges in Gegenwart der Triphosphate von A, C und G sowie TTP **82** zu n+5. Auch in der Probe „T*, C, G“ erfolgt eine vollständige Elongation des Stranges, sodass ein zur Probe „N*“ analoges Ergebnis erhalten wird.

Wird jetzt die nachfolgende Probe „T*, C“ betrachtet, so sollte in Abwesenheit von G und A lediglich eine maximale Verlängerung von n+3 zu erkennen sein. Jedoch ist auch hier in geringem Maße die Verlängerung bis zu n+5 sichtbar, was auf die hohe Fehlerrate der HIV-RT Polymerase zurückzuführen ist. In der letzten Probe „T*“ ist dagegen nur der erwartete kanonische Einbau festzustellen.

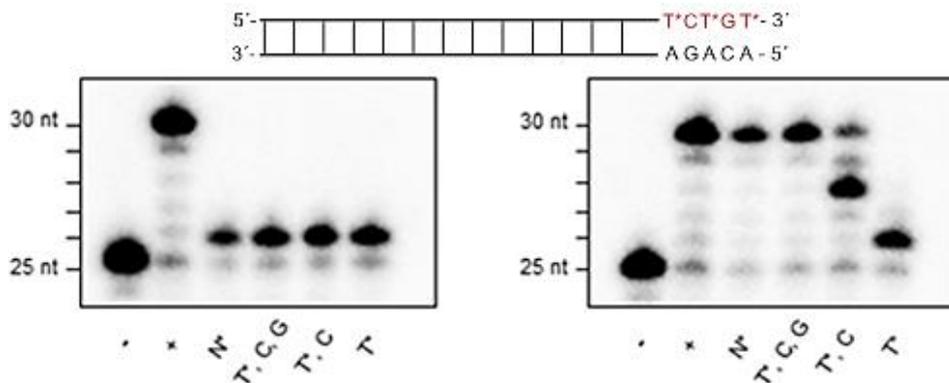


Abbildung 72: Autoradiogramm der gelelektrophoretischen Auftrennung der *primer extension assays* unter Verwendung des BAB-d4T-Triphosphat-Prodrugs (links) sowie des BAB-Thymidin-Triphosphat-Prodrugs (rechts).^[73,74]

Unabhängig von der Fehlerrate der verwendeten Polymerase HIV-RT bestätigen diese Ergebnisse anschaulich die erfolgreiche enzymatische Freisetzung der Triphosphate aus den jeweiligen TriPPP-Pro-Verbindungen, indem d4TMP **81** nach Insertion die weitere DNA-Elongation verhindert und das natürliche TTP eine vollständige Elongation ermöglicht. Durch die direkte Einführung der Triphosphate mittels des BAB-TriPPP-Pro-Konzepts ins Zellsystem kann die gesamte Phosphorylierungskaskade zum biologisch aktiven Metabolit umgegangen werden.

Allerdings zeigten vorangegangene Untersuchungen, dass die chemische Hydrolyse von TriPPP-Pro-Drugs, neben der gewünschten Freisetzung des Triphosphats (Abbildung 73, Weg C/D), in Konkurrenzreaktionen auch zur Bildung von Nucleosid-Monophosphat (Weg A) sowie des entsprechenden Diphosphats (Weg B) als Nebenprodukt führen kann.^[73]

Wie bereits am Beispiel von AZT **1** skizziert, können die geringer phosphorylierten Metabolite toxische Effekte hervorrufen. Neben diesen chemischen Freisetzungsmechanismen besteht *in vivo* zusätzlich die Möglichkeit, dass das freigesetzte Triphosphat über eine natürliche Abbaukaskade durch Phosphatasen zu dem Di-, Monophosphat oder sogar dem Nucleosid abgebaut wird. Dementsprechend sollte es ein Ziel sein, das Nucleosid so zu modifizieren, dass in der Zelle der Abbau und die damit einhergehende Cytotoxizität bestmöglich minimiert wird.

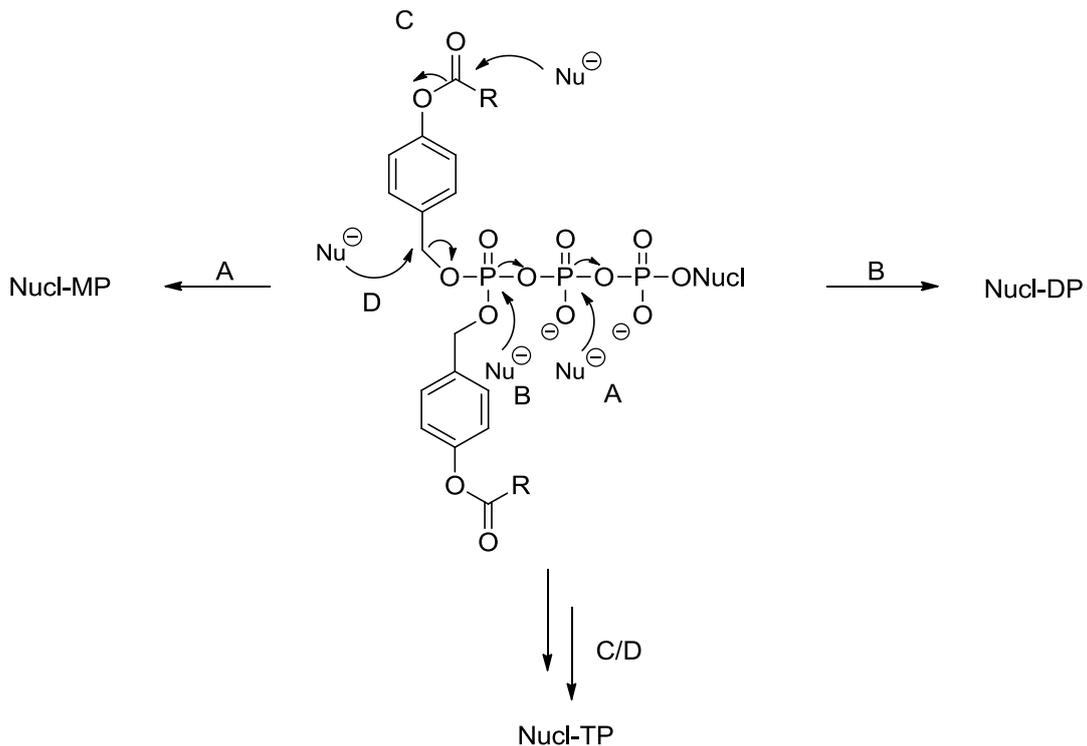


Abbildung 73: Mögliche chemische Hydrolyse eines BAB-TriPPPPro-Prodrugs.

6.2.2 Evaluierung eines Konzeptes basierend auf γ -modifizierten-Triphosphat-Nucleosiden

Auf Basis der in Kapitel 6.2.1 erläuterten Erkenntnisse ist an dieser Stelle die Entwicklung einer Prodrug-Strategie für Nucleosidanaloga erstrebenswert, die zwei Ziele verfolgt. Zum einen wäre eine Differenzierung der Substratspezifität zwischen viralen und wirtseigenen Polymerasen zielführend, zum anderen ist von hoher Wichtigkeit, eine schnelle Dephosphorylierung der Triphosphat-Nucleoside durch zelleigene Phosphatasen zu verhindern.

Zum ersten Punkt konnten ALEXANDROVA und KRAYEVSKY in *primer extension assays* feststellen, dass mono- γ -modifizierte Nucleosidtriphosphate, die eine Methylester-Einheit am γ -Phosphat **83** oder ein Arylphosphonat **84** anstelle des γ -Phosphats tragen, lediglich Substrate für die virale HIV-Polymerase darstellen und von den humanen DNA-Polymerasen kaum oder gar nicht als Substrat erkannt werden (Abbildung 74).^[128,129,130,131]

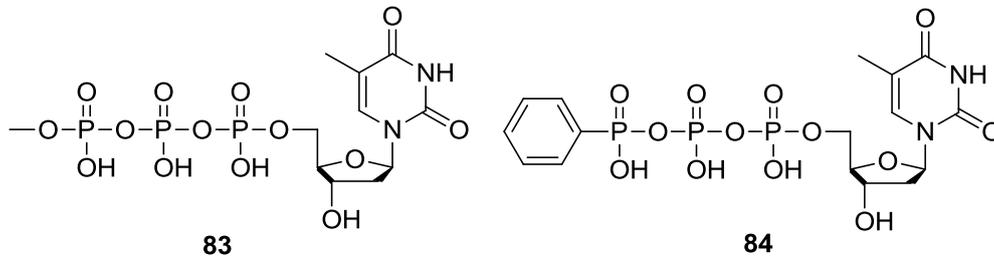


Abbildung 74: Literaturbekannte mono- γ -modifizierte Nucleosidtriphosphate.^[128,129,130]

Da die publizierten Verbindungen jedoch aufgrund ihrer Polarität und der damit verbundenen mangelhaften Permeabilität nicht als potentielle Virustatika eingesetzt werden können, wurden seitdem keine weiteren Untersuchungen mit mono- γ -modifizierten Nucleosidtriphosphaten durchgeführt.

Basierend auf diesen Beobachtungen sollte, in einer Kooperation mit TRISTAN GOLLNEST, erstmals eine BAB-TriPPPPro-Verbindung **85** verschiedenen Polymerasen in *primer extension assays* zur Verfügung gestellt werden (Abbildung 75). Diese Untersuchungen sollten zeigen, inwieweit solche Verbindungen bereits Substrate für bestimmte Polymerasen darstellen bzw. ob dadurch möglicherweise eine Differenzierung der Substratspezifität zwischen den Polymerasen erzielt werden kann.

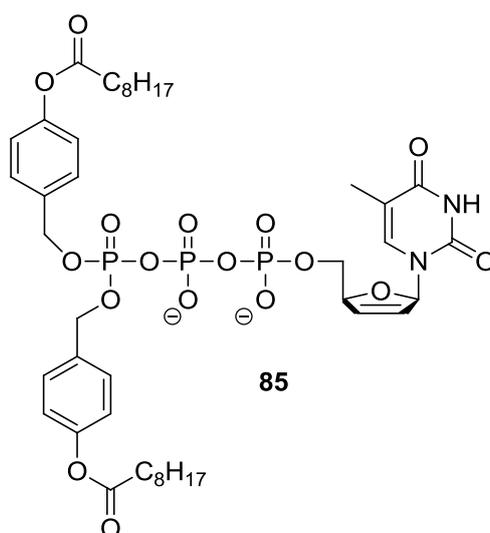


Abbildung 75: Struktur des verwendeten TriPPPPro-d4T-Triphosphat-Prodrugs **85**.

Ausgehend von dem Prodrug **85** können, entsprechend dem in Abbildung 73 skizzierten Hydrolysemechanismus, durch chemische Spaltung verschiedene Metabolite, wie das d4TTP **80**, gebildet werden. Da dieses Triphosphat **80** ein bereits bestätigtes Substrat für die verwendete virale Polymerase ist und daher die Ergebnisse der *primer extension assays* verfälschen würde, musste im Vorfeld sichergestellt werden, dass a) in der erhaltenen Prodrugstammlösung kein Triphosphat als Verunreinigung vorlag und b) unter den Bedingungen des *primer extension assays* (Puffer-System und Zeitdauer von 10 Minuten) keine Degradation des Prodrugs erfolgt. Entsprechende Stabilitätsstudien und Reinheitsläufe wurden dazu unter Anwendung der HPLC-Chromatographie vorgenommen.

Wie aus dem Chromatogramm (Abbildung 76) ersichtlich ist, sind bereits in der Stammlösung (0 min) von d4TTP **80** (eluiert nach 17.59 min) diverse Abbauprodukte festzustellen. Bei 12.48 min ist ein Peak zu erkennen, der bereits aus vorherigen Arbeiten bekannt ist und auf Basis der Retentionszeit dem Intermediat **86** (resultierend aus dem d4T-BAB-TriPPPPro **85**) zugeordnet werden kann. Durch eine Coinjektion wurde zusätzlich das Signal bei 7.36 min als d4T-Diphosphat **87** identifiziert. D4T-Triphosphat **80** konnte dagegen nicht detektiert werden. Den Chromatogrammen ist außerdem durch die Integration der Peakflächen zu entnehmen, dass eine 10-minütige Inkubationszeit in dem schwach basischen *primer extension assay*-Puffer-System keine signifikante Degradation des BAB-TriPPPPro **85** zur Folge hat.

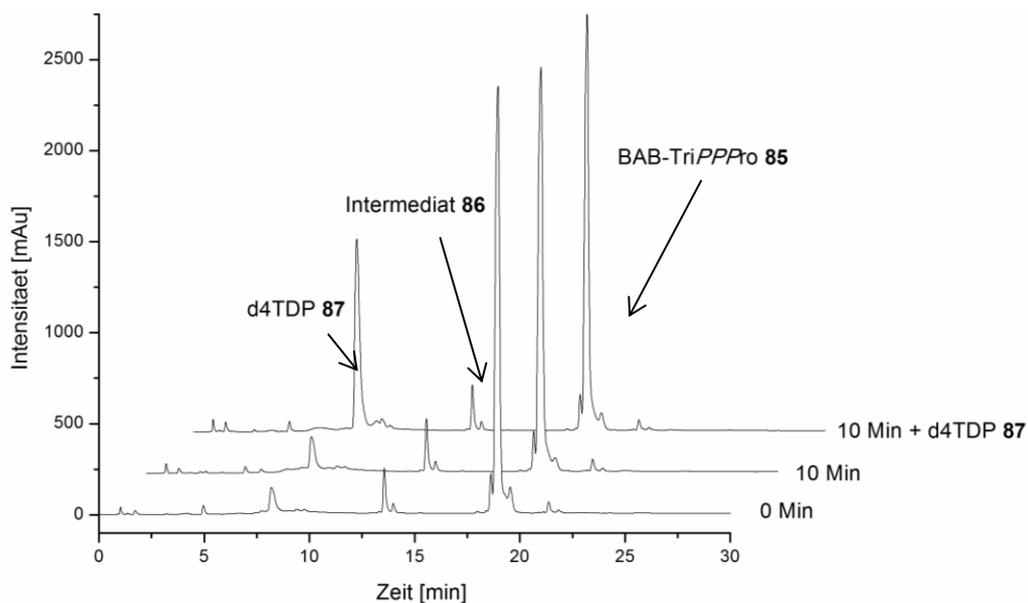


Abbildung 76: HPLC-Chromatogramme der eingesetzten TriPPPPro-Prodrug-haltigen **85** Lösung zur Überprüfung hinsichtlich der Reinheit sowie der Bildung von Abbauprodukten.

Es ist allerdings anzumerken, dass die Probe 6.8% an Intermediat **86** beinhaltet. Dieser Aspekt ist nicht zu vernachlässigen, denn in den *primer extension assay* Studien wird ein 125-facher Überschuss an Substrat zu Templat verwendet. Das bedeutet, dass selbst ein 1%iger Anteil an potentiellen Substraten ausreichen würde, um den Templatstrang vollständig zu elongieren. Die aus dem Chromatogramm ermittelten 6.8% an Intermediat **86** stellen somit eine ausreichende Menge dar, um den Einbau von $n+1$ zu $n = 26$ nt als falsch positives Ergebnis ausfallen zu lassen. Es lässt sich folglich nicht eindeutig feststellen, welche der Verbindungen als Substrat diente.

Wie bereits diskutiert, können mono- γ -modifizierte Nucleosidtriphosphate Substrate für die virale Polymerase HIV-RT darstellen.^[128,129,130,131] Um auszuschließen, dass das monomaskierte Intermediat **86** einen Einbau verursacht, wurde eine Verdünnungsreihe des BAB-TriPPPPro-Prodrugs **85** sowie des entsprechenden Intermediates **86** erstellt und in *primer extension assays* auf dessen Substrateigenschaften untersucht (Abbildung 77 und 78). Durch diese Verdünnungsreihen können nun quantitative Aussagen zueinander getroffen werden.

Das erhaltene Autoradiogramm der Verdünnungsreihe des BAB-TriPPPPro-Prodrugs **85** ist in Abbildung 77 gezeigt. Werden 50 pmol (wie in Kapitel 6.1.3.3) an Substrat für *primer extension assays* verwendet, so ist ein deutlicher Einbau zu $n=26$ nt zu erkennen (rotes Rechteck). Doch bereits ab der ersten gewählten Verdünnungsstufe (6 pmol) findet nahezu kein Einbau mehr statt. Dies lässt vermuten, dass der beobachtete Einbau nicht von dem BAB-Prodrug **85** selbst ausgeht, sondern vielmehr von dem monomaskierten Intermediat **86**.

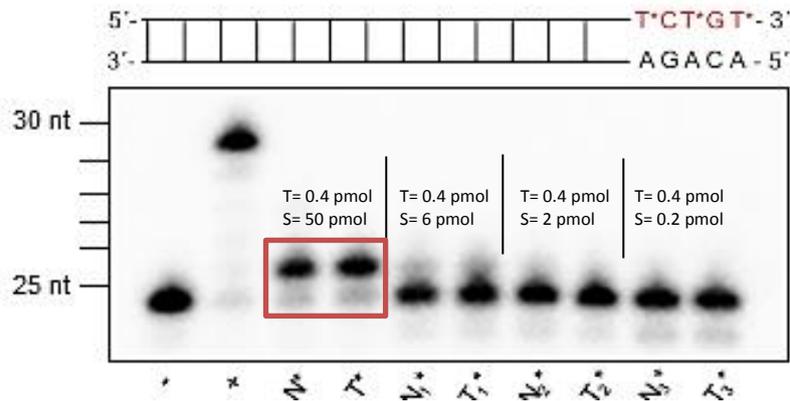


Abbildung 77: Autoradiogramm der gelelektrophoretischen Auftrennung einer Verdünnungsreihe des BAB-TriPPPPro-Prodrugs **85** nach dem *primer extension assay*.

Diese These wird bei der Analyse des Intermediats **86** bestätigt. Das erhaltene Autoradiogramm in Abbildung 78 zeigt, dass ein nahezu vollständiger Umsatz zu $n+1$ (= 26 nt) stattfindet, solange das Substrat im Überschuss zum Templat vorliegt. Selbst in der letzten Probe (0.2 pmol), in welcher das Substrat die Unterschusskomponente darstellt, ist in geringem Maße ein Einbau zu $n+1$ erkennbar. Diese Ergebnisse lassen annehmen, dass nicht das TriPPPPro-Derivat **85** als Substrat der verwendeten Polymerase dient, sondern das aus ihm gebildete monomaskierte Intermediat **86**.

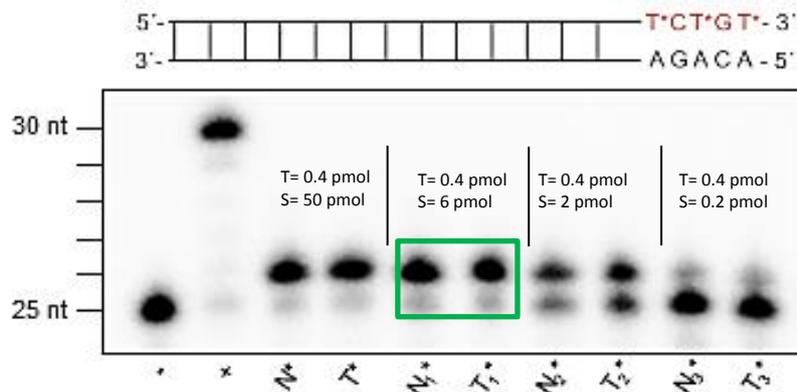


Abbildung 78: Autoradiogramm der gelelektrophoretischen Auftrennung einer Verdünnungsreihe des Intermediats **86** nach dem *primer extension assay*.

Um sicherzustellen, dass das Intermediat **86** vor oder während des Assays nicht zu einem gewissen Anteil zu dem entsprechenden d4T-Triphosphat **80** zerfallen ist, wurde analog zu den obigen Untersuchungen des BAB-TriPPPPro-Prodrugs **85** ein Stabilitätstest durchgeführt.

Hierzu wurde das Intermediat **86** in dem *primer extension assay*-Puffer-System für 10 Minuten inkubiert und anschließend mittels HPLC-Chromatographie analysiert (Abbildung 79). Erwartungsgemäß fand keine feststellbare Hydrolyse des Intermediats **86** zum d4TTP **80** statt.

Diese Beobachtung stimmt mit dem Umstand überein, dass die Intermediate aufgrund der zusätzlichen negativen Ladung im Vergleich zu den BAB-TriPPPro-Prodrugs generell stabiler sind. Bereits für das BAB-TriPPPro-Prodrug **85** ließ sich über den 10-minütigen Inkubationszeitraum keine Hydrolyse beobachten.

Wie aus dem Chromatogramm ersichtlich, beinhaltet die für die *primer extension assays* verwendete Probe des Intermediats **86** (Signal bei 13.23 Minuten) nach 10 Minuten 0.93% des d4T-Triphosphats **80** (Signal bei 9.21 Minuten), dessen Identität durch Coinjektion in einem zweiten HPLC-Lauf (Spur 2; 10 Min + d4TTP **80**) bestätigt werden konnte.

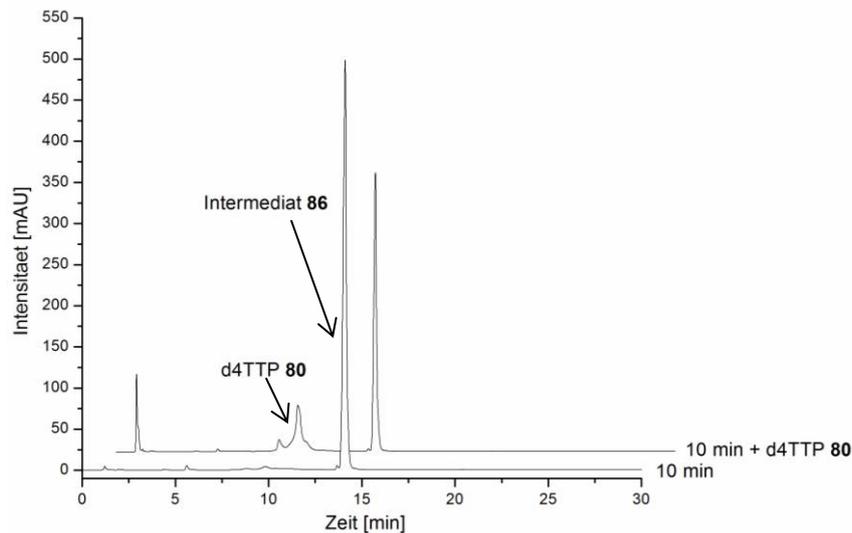


Abbildung 79: HPLC-Chromatogramm der eingesetzten Intermediat-haltigen **86** Lösung zur Überprüfung hinsichtlich der Reinheit sowie der Bildung von Abbauprodukten.

Um zu überprüfen, ob das BAB-Prodrug **85** oder das Intermediat **86** als Substrat für das Enzym wirkt, wurde im Folgenden eine analoge Verdünnungsreihe der Triphosphat-Verbindung **80** erstellt und anschließend in den *primer extension assays* untersucht.

Das Autoradiogramm in Abbildung 80 offenbart ein zu Abbildung 78 kongruentes Resultat. In allen untersuchten Proben, in denen das d4T-Triphosphat **80** als Überschusskomponente gegenüber dem Templat vorlag, wurde eine nahezu vollständige Elongation zu 26 nt beobachtet. Lediglich in der letzten Probe, in welcher das Substrat im Unterschuss eingesetzt wurde, ist nur ein marginaler Umsatz zu n+1 festzustellen.

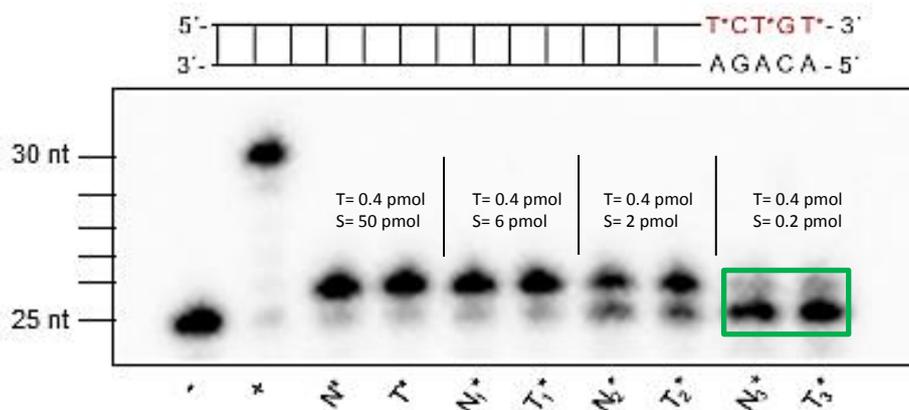


Abbildung 80: Autoradiogramm der gelelektrophoretischen Auftrennung einer Verdünnungsreihe des d4T-Triphosphats **80** nach dem *primer extension assay*.

Wie bereits in den HPLC-Studien belegt, sind in der verwendeten Intermediat-Probe 0.93% an Triphosphat vorhanden (Abbildung 80). Die Konsequenz lässt sich wie folgt darstellen: Die 0.93% des Triphosphats ergeben in einem 6 pmol Ansatz (grüner Kasten, Abbildung 78) in der Verdünnungsreihe des Intermediats **86** eine Konzentration von 0.06 pmol. Die Auswertung des entsprechenden Autoradiogramms zeigt, dass in diesem Fall ein quantitativer Umsatz zu 26 nt deutlich zu erkennen ist.

Werden die Ergebnisse ausgehend von der Konzentration 0.06 pmol d4TTP **80** aus dem 6 pmol Ansatz des Intermediates **86** (Abbildung 78) auf das Autoradiogramm der Verdünnungsreihe von d4T-Triphosphat **80** übertragen, so dient die letzte untersuchte Konzentration von 0.2 pmol als Referenz (Abbildung 80, grüner Kasten). In dieser letzten Probe (Substratkonzentration = 0.2 pmol) wird nahezu kein Umsatz zu 26 nt festgestellt (Abbildung 80). Das lässt den Rückschluss zu, dass der geringe Anteil von 0.06 pmol d4TTP **80** (ca.1%) lediglich einen untergeordneten Einfluss auf den mit dem Intermediat **86** durchgeführten Assay hätte (Abbildung 78). Dennoch ist in der Verdünnungsreihe des Intermediates **86**, trotz des geringen Anteils d4TTP **80**, ein vollständiger Umsatz zu 26 nt ersichtlich (Abbildung 78). Daraus schlussfolgernd ergibt sich, dass die HIV-RT *in vitro* neben dem Triphosphat auch das Intermediat **86** als Substrat erkennt und als solches verwendet.

Um den endgültigen Beweis zu erbringen, dass monomaskierte Verbindungen, wie das Intermediat **86**, und nicht deren durch chemische Hydrolyse freigesetzte Nucleosidtriphosphate (hier z.B. d4T-Triphosphat **80**) als Substrat fungieren und den Einbau eines d4T-Bausteins ermöglichen, galt es, ein modifiziertes Konzept zur Darstellung von Triphosphat-Prodrugs zu entwickeln.

Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen der bisher vorgestellten TriPPP_{ro}-Verbindungen, konnte in einer Kooperationsarbeit mit TOBIAS NACK ein neuartiger Triphosphat-Prodrug-Ansatz konzipiert werden.

Die innovativen Prodrug-Verbindungen, wie z.B. das TriPPP_{ro}-Derivat **88**, sollten neben einer klassischen 4-Acyloxybenzyl-Einheit als lipophile Maske eine zweite nicht enzymatisch spaltbare Gruppe an der γ -Phosphatgruppe beinhalten. Durch enzymatische Initiierung sollte intrazellulär die biolabile Maske entfernt und das stabile γ -monoveresterte Nucleosidtriphosphat **89** freigesetzt werden (Abbildung 81). Eine Abspaltung der zweiten Maske ist im Anschluss aufgrund der fehlenden Esterfunktion nicht mehr möglich, wodurch der Polymerase nur das monomaskierte Triphosphat als Substrat zur Verfügung stehen würde.

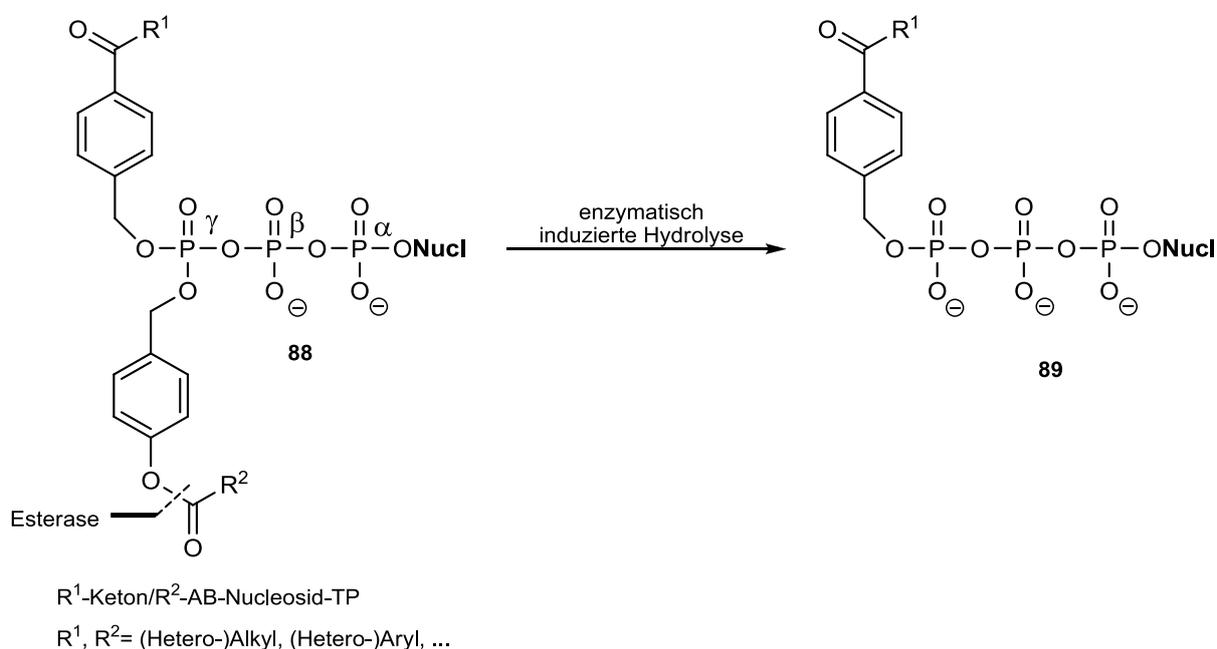


Abbildung 81: Schematische Darstellung des enzymatischen Hydrolysemechanismus zur Generierung des γ -monomodifizierten Nucleosidtriphosphats **89**.

TOBIAS NACK gelang es, sowohl das stabile γ -monoveresterte und hydrolysestabile Nucleosidtriphosphat **90** (Abbildung 82) als auch das dazugehörige Prodrug des natürlichen Thymidins erfolgreich darzustellen.

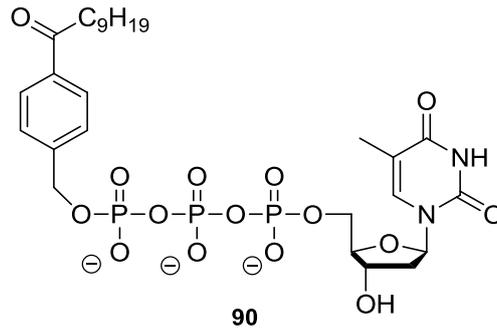


Abbildung 82: Darstellung des γ -monoveresterten Nucleosidtriphosphats **90**.

Obwohl die doppelmaskierten Prodrugs nachweislich keine direkten Substrate der Polymerase sind (vgl. vorherige Resultate), ist dessen Einsatz notwendig, um durch ihre Lipophilie die Permeabilität zu gewährleisten und den Wirkstoff ins Zellmedium zu transportieren. Zur Untersuchung der Substratspezifität in *primer extension assays* war jedoch die direkte Darstellung der stabilen γ -monoveresterten Nucleosidtriphosphate zielführender (z.B. die γ -monoveresterte Verbindung **90**).

Die vorherigen Ergebnisse der Untersuchungen des spaltbaren Intermediats **86**, das von der viralen HIV-RT als Substrat akzeptiert wurde, lassen vermuten, dass aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit auch das γ -monoveresterte Nucleosidtriphosphat **90** als Substrat für die Polymerase dienen würde. Diese These galt es in weiteren *primer extension assays* zu hinterfragen.

Entsprechend wurde, unter den zuvor etablierten Bedingungen des *primer extension assays*, das in Abbildung 83 gezeigte Autoradiogramm erhalten. Wie aus der Auftrennung der Probe „N*“ zu entnehmen ist, erfolgt eine quantitative Umsetzung zu n+5. Diese vollständige Strangverlängerung impliziert, dass die HIV-RT das γ -monoveresterte Nucleosidtriphosphat **90** als Substrat erkennt und in den wachsenden DNA-Strang einbaut. Ein konsistentes Ergebnis wurde ebenfalls für die Probe „T*“ erhalten, in der die Elongation nach einem einmaligen Einbau des Thymidins aufgrund der fehlenden Triphosphate (A, C, G) erwartungsgemäß zum Erliegen kommt.

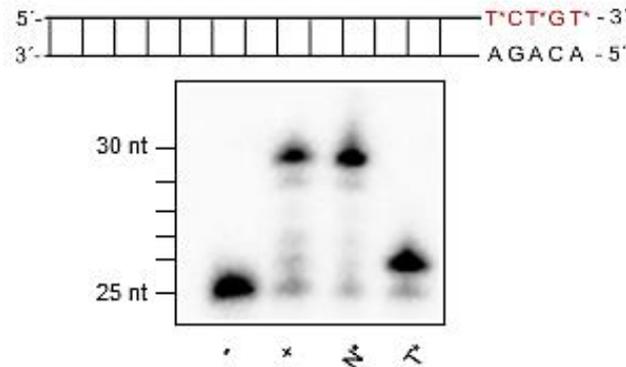


Abbildung 83: Autoradiogramm der gelelektrophoretischen Trennung eines *primer extension assays* unter der Verwendung des γ -monoveresterten Nucleosidtriphosphats **90** als potentielles Substrat der HIV-RT.

Um Unterschiede bezüglich der Substratspezifität zwischen viralen und zellulären Polymerasen zu evaluieren, wurden analoge Studien mit den humanen DNA-Polymerasen β und γ durchgeführt (Abbildung 84). Im linken Autoradiogramm der Abbildung 84 ist die Studie mit der humanen DNA-Polymerase β gezeigt. Wie deutlich ersichtlich ist, erfolgt in der Probe „T“ durch den kanonischen Einbau des natürlichen Substrates T eine Umsetzung zu n+1. In Probe „T*“ ist bei Anwesenheit des Substrates **90** kein Einbau zu erkennen. Analoge Ergebnisse werden bei Verwendung der humanen DNA-Polymerase γ erhalten (Abbildung 84, rechte Seite).

Damit tritt bezüglich der Substratspezifität zwischen der viralen HIV-RT und den humanen Polymerasen β und γ eindeutig eine Differenzierung gegenüber der stabilen γ -monoveresterten Verbindung **90** auf, denn lediglich das virale Enzym HIV-RT akzeptiert das γ -monoveresterte Nucleosidtriphosphat **90** als Substrat.

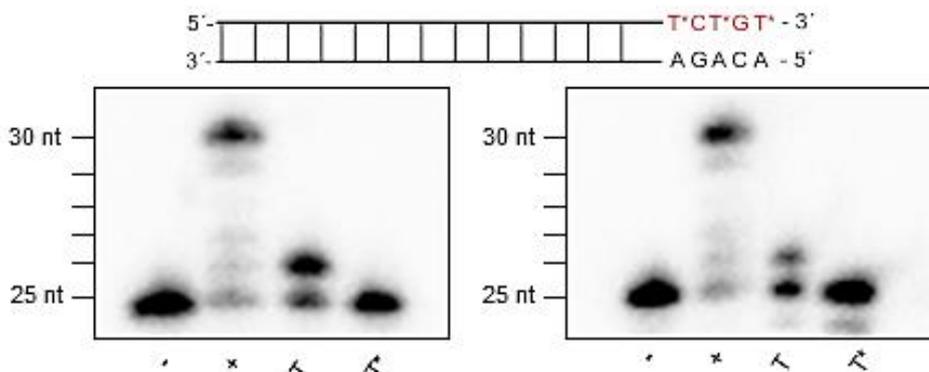


Abbildung 84: Autoradiogramm der gelelektrophoretischen Trennung eines *primer extension assays* unter der Verwendung der γ -monoveresterten Verbindung **90** als potentielles Substrat der humanen DNA-Polymerase β (links) sowie der humanen DNA-Polymerase γ (rechts).

Mit diesen Resultaten konnten Beobachtungen aus den 90er Jahren bestätigt werden, die γ -modifizierte-Nucleosidanaloga als Substrate für die virale Polymerase HIV-RT identifizierten, wohingegen humane DNA-Polymerasen derartige Verbindungen nicht als Substrate akzeptieren.

Jedoch wiesen die damals verwendeten Modifikationen am γ -Phosphat der Nucleosidtriphosphate einen wesentlich geringen sterischen Anspruch auf. Die von ALEXANDROVA und VICTOROVA getesteten Verbindungen wiesen daher eine hohe Polarität auf, die einer *in-vivo*-Anwendung entgegenstanden.

Die ersten vielversprechenden Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit lipophilen stabilen monomaskierten Verbindungen könnten jedoch erstmalig eine Möglichkeit bieten, die entsprechenden γ -modifizierten-Nucleosidanaloga medizinisch zu nutzen.

Zur Verdeutlichung sollte das Konzept der lipophilen stabilen monomaskierten Verbindungen, nachdem es zuvor lediglich auf den natürlichen Baustein Thymidin angewendet wurde, auch auf das Nucleosidanalogen d4T **91** übertragen werden.

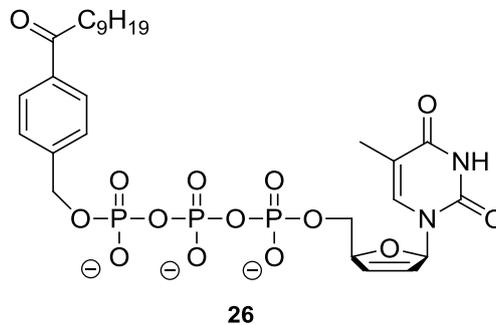


Abbildung 85: Darstellung des γ -monoveresterten d4T-Triphosphats **26**.

Das γ -modifizierte d4TTP **26** wurde erneut von TOBIAS NACK zur Verfügung gestellt, um damit *primer extension assays* mit der viralen Polymerase HIV-RT durchzuführen. Die daraus resultierenden Autoradiogramme sind in Abbildung 86 und Abbildung 87 aufgeführt. Wie in Abbildung 86 ersichtlich, zeigen die jeweiligen Proben „N*“ und „T*“ den zu erwartenden einfachen Einbau zu n+1 (26 nt). Aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylfunktion von d4T **91** findet im Anschluss selbst in Anwesenheit der weiteren natürlichen Bausteine („N*“, exklusive Thymidin) keine Elongation statt.

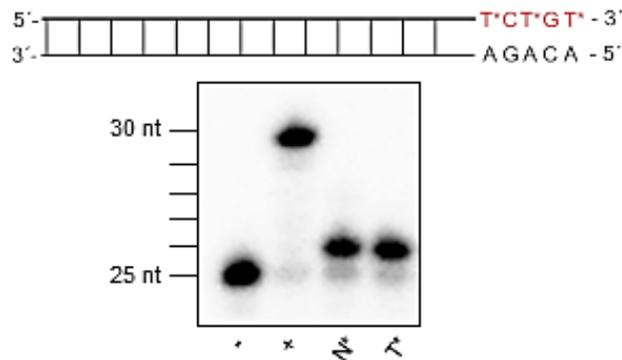


Abbildung 86: Denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese von *primer extension assays* unter Verwendung des γ -modifizierten d4T-Triphosphats **26** mit der HIV-RT.

Um zudem die Differenzierung der Substratspezifität zwischen viraler und zellulärer Polymerasen gegenüber der entsprechenden Klasse an Nucleosidanaloga zu bestätigen, wurden entsprechende *primer extension assays* mit γ -modifiziertem d4TTP **26** durchgeführt. Dabei diente die humane DNA-Polymerase β als Beispiel zellulärer Polymerasen. Zur besseren Veranschaulichung ist das d4TTP **80** der γ -modifizierten Verbindung **26** gegenübergestellt (Abbildung 87). Wie aus dem linken Autoradiogramm ersichtlich ist, wird das Triphosphat **80** sowohl in der Probe „N“ als auch in der Probe „T“ teilweise in den Strang eingebaut, sodass jeweils eine Strangverlängerung zu $n = 26$ nt erfolgt.

In dem rechten Autoradiogramm der Abbildung 87 sind die Untersuchungsergebnisse der stabilen, γ -modifizierten Verbindung von d4T **26** gezeigt. Dort ist im Gegensatz zu d4TTP **80** in den Proben „N“ und „T“ keine Insertion zu beobachten. Dies impliziert, dass die humane DNA-Polymerase β das γ -monoveresterte Nucleosidtriphosphat **26** nicht als Substrat erkennt. Daraus ergibt sich, dass auch hier eine Differenzierung der Substratspezifität zwischen viralen und zellulären Polymerasen vorliegt.

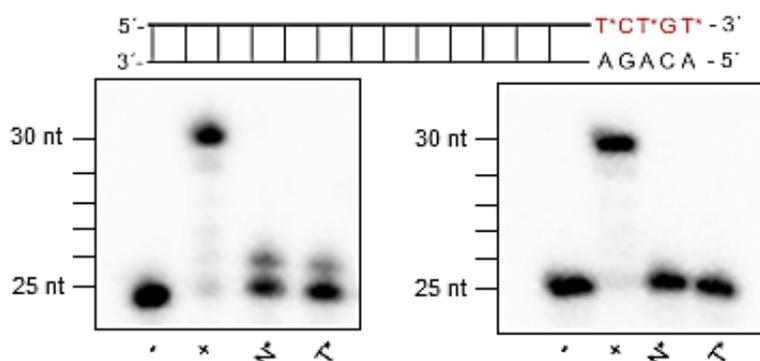


Abbildung 87: Autoradiogramme der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese der Reaktionen mit der humanen DNA-Polymerase β unter Verwendung von d4T-Triphosphat **80** (links) und γ -modifiziertem Triphosphat **26** (rechts).

Wie bereits beschrieben, ist eine direkte Applikation des γ -modifizierten Triphosphats nicht sinnvoll, da die polare Verbindung eine unzureichende Permeabilität mit sich bringen würde.

Um eine ausreichende Zellaufnahme gewährleisten zu können, müssen diese Verbindungen als zweifach maskierte Prodrugs mit einer ausreichenden Lipophilie verabreicht werden, wobei die zweite Maske entsprechend dem klassischen TriPPP_{ro}-Konzept biolabil sein sollte (Abbildung 88). Dadurch kann nach erfolgreicher Zellaufnahme die stabile, γ -modifizierte Verbindung intrazellulär durch enzymatische Hydrolyse freigesetzt werden.

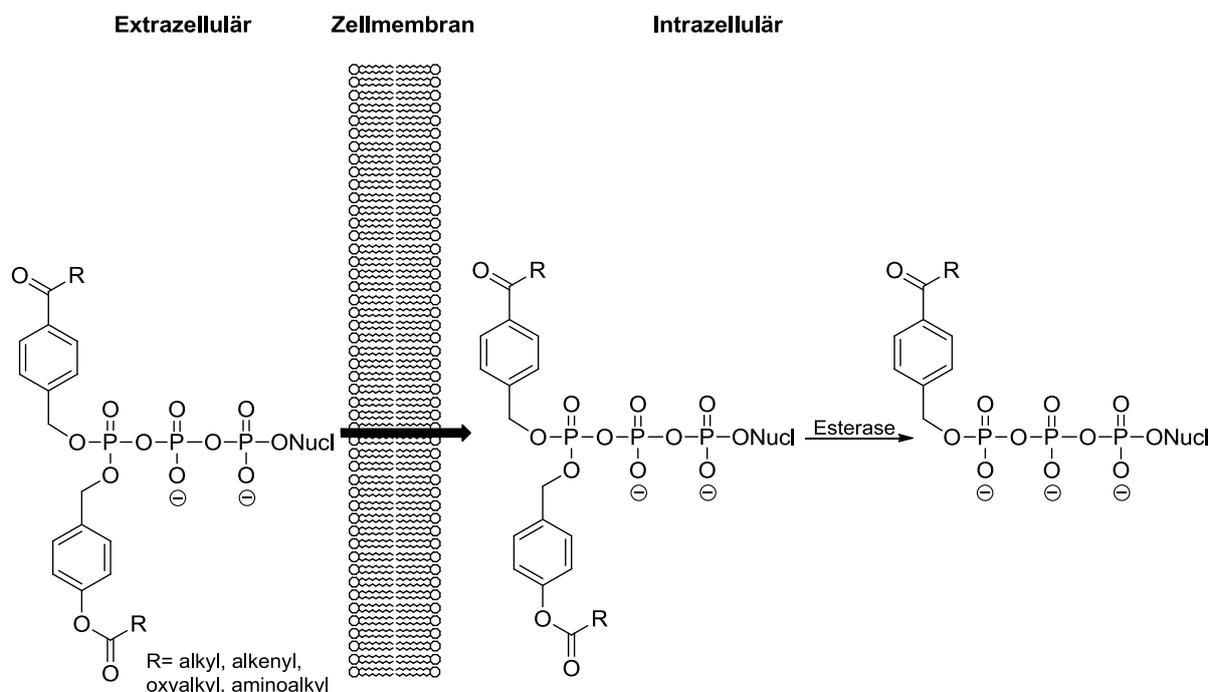


Abbildung 88: Postulierter Vorgang des neuartigen TriPPP_{ro}-Prodrugs nach Zelleintritt.

Einen indirekten Nachweis für eine effiziente Zellaufnahme dieser Verbindungen liefern deren antivirale Aktivitäten (Tabelle 5). In Kooperation mit DOMINIQUE SCHOLS wurden die in der Tabelle aufgeführten Substanzen entsprechend gegen die beiden Subtypen von HIV getestet. Das antiviral aktive Nucleosidanalogon d4T **91** diente dabei als Referenzsubstanz und weist in HIV-1- sowie HIV-2-infizierten Zelllinien eine gute antivirale Aktivität auf. Der angeführte EC₅₀-Wert entspricht stets der effektiven Konzentration eines Wirkstoffs, bei der in 50% der Zellen die Virusreplikation unterdrückt wird. In den Thymidylat-Kinase defizienten Zellen (TK⁻) ergibt sich ein EC₅₀-Wert von 150 μ M, was dadurch erklärbar ist, dass in dieser Zelllinie keine Expression der Thymidylat-Kinase erfolgt, wodurch die Umwandlung von d4T **91** zum biologisch aktiven Triphosphat stark unterbunden wird.

Neben dem bereits vorgestellten Prodrug **85** wurden von TOBIAS NACK weitere Prodrugs (Tabelle 5, Verbindungen 2-6) für die Analyse zur Verfügung gestellt. Das mit zwei biolabilen Masken ausgestattete C4/C17-TriPPPro-d4T-Prodrug weist im Vergleich zum Nucleosidanalogon **91** deutlich bessere Aktivitäten in den HIV-1- und HIV-2-Zelllinien auf. Dies bedeutet, dass der biologisch aktive Triphosphat-Metabolit nach erfolgreicher Zellaufnahme und Abspaltung der Masken in ausreichender Menge erhalten wird, um eine antivirale Aktivität zu generieren.

Vor allem ist aber in der TK-Zelllinie des C4/C17-TriPPPro-d4T-Prodrugs ein signifikanter Unterschied zum d4T **91** zu beobachten, da das C4/C17-TriPPPro-d4T-Prodrug einen fast 280-mal höheren EC₅₀-Wert aufweist. Dementsprechend ist das Fehlen der Thymidylat-Kinase für die antivirale Aktivität nicht von Bedeutung, da entsprechend dem postulierten Mechanismus die erfolgreiche Freisetzung eines triphosphorylierten Metaboliten aus dem Prodrug erfolgt.

Auch die anderen untersuchten Verbindungen (Tab. 5; Verbindungen 3-6), die eine biolabile und ein nicht spaltbare Gruppe unterschiedlicher Längen tragen, zeigen die gleichen Tendenzen. Damit ist zum einen bestätigt, dass diese TriPPPro-Verbindungen ebenfalls eine sehr gute Zellgängigkeit aufweisen und zum anderen, dass nach der Abspaltung der biolabilen Maske das einfach maskierte γ -modifizierte-Triphosphat die antiviral aktive Verbindung darstellt. Folglich konnte ein weiterer Beweis für die Tauglichkeit der neuen TriPPPro-Generation erbracht werden. Zudem ist aus Tabelle 5 zu entnehmen, dass deren Toxizitätswerte (CC₅₀) durchgehend in einem für Prodrugs tolerierbaren Konzentrationsbereich liegen.

Tabelle 5: Antivirale Daten verschiedener TriPPPro-Verbindungen.

Verbindung	Nucleosid	R1	R2	HIV-1 EC ₅₀ (μM)	HIV-2 EC ₅₀ (μM)	TK ⁻ HIV-2 EC ₅₀ (μM)	CEM CC ₅₀ (μM)
1	d4T (Nucl.-Analogon)	---	---	0.33±0.13	0.97±0.50	150±7	79±3
2	d4T-TriPPPro	C4	C17	0.12±0.05	0.10±0.03	0.54±0.41	33±7
3	d4T-TriPPPro	C4	C9-Keton	0.37±0.24	1.2±0.92	2.5±1.8	25±3
4	d4T-TriPPPro	C6	C17-Keton	0.44±0.28	1.1±0.83	0.40±0.15	34±12
5	d4T-TriPPPro	C17	C9-Keton	0.58±0.32	0.78±0.51	1.1±0.75	35±6
6	d4T-TriPPPro	C17	C17-Keton	0.42±0.18	0.83±0.43	0.38±0.19	28±2

Zusätzlich zu der antiviralen Aktivität ist auch die Stabilität der Analoga ein maßgeblicher Anhaltspunkt zur Eignung der Analoga für künftige medizinische Applikationen. Aus diesem Grund wurde von TOBIAS NACK ergänzend die Stabilität von γ -monoverestertem d4TTP **26** im CEM/0-Zellextrakt getestet.

Der Abbau bzw. Zerfall des γ -modifizierten Triphosphats **26** wurde dabei mit Hilfe zeitversetzter HPLC-Messungen verfolgt (Abbildung 89). Anhand der generierten Daten kann gezeigt werden, dass das γ -modifizierte d4TTP **26** auch über eine Dauer von 1260 Minuten stabil bleibt. Diese Studie zeigt also, dass trotz der im Zellextrakt enthaltenen Phosphatasen kaum eine Dephosphorylierung stattfindet.

Im Idealfall könnten diese neuartigen Prodrugs *in vivo* also wesentlich länger als biologisch aktive Verbindungen im zellulären Raum vorliegen, ohne durch den katabolen Abbau eventuell in nicht aktive oder gar toxische Metabolite überführt zu werden.

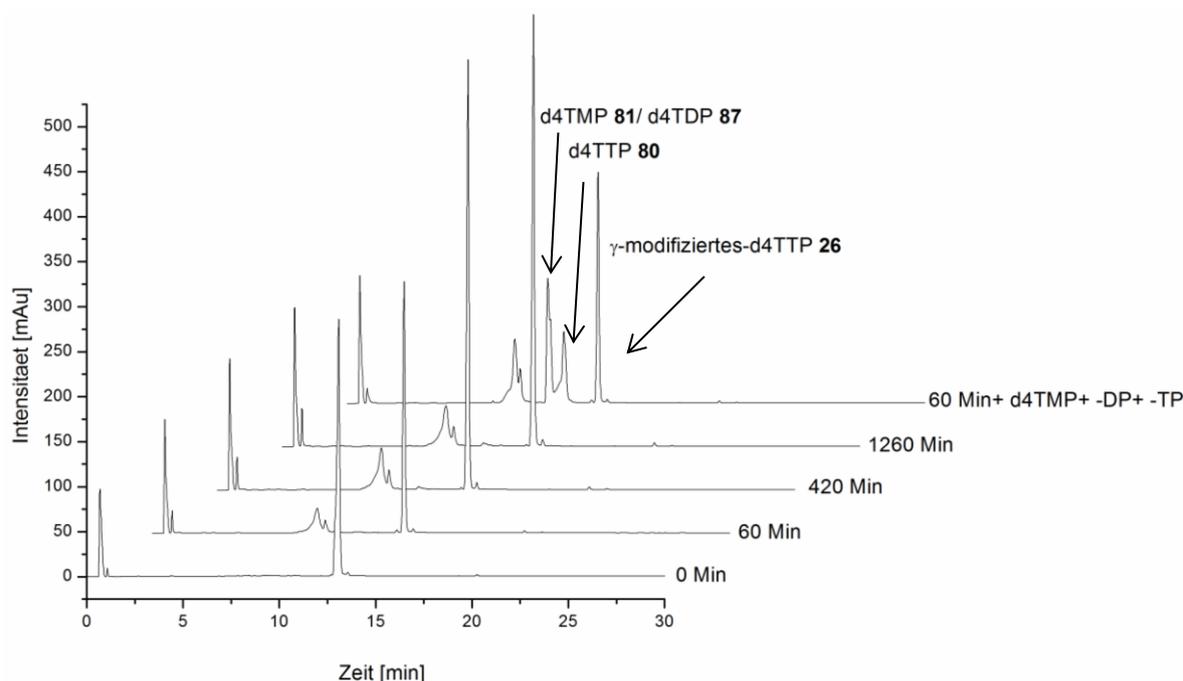


Abbildung 89: HPLC-Chromatogramme der Hydrolyse von **26** in CEM/0-Zellextrakt nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

Als Fazit der beschriebenen Ergebnisse kann die sehr erfolgreiche Weiterentwicklung des TriPPP-Pro-Konzepts angeführt werden. Durch den Austausch einer spaltbaren Maskierungseinheit gegen eine nicht spaltbare Gruppe bleiben die Hauptcharakteristika des ursprünglichen TriPPP-Pro-Konzepts zwar erhalten, jedoch stellt bei den Prodrugs der neuen Generation die γ -monoveresterte Verbindung – und nicht mehr das Triphosphat – die antiviral aktive Verbindung dar. Neben dem Nachweis der antiviralen Eigenschaften dieser Verbindungen konnte in *primer extension assays* zudem gezeigt werden, dass eine selektive Inhibierung der DNA-Synthese von viralen Polymerasen erzielt wird. Im Gegensatz zu der viralen HIV-RT akzeptieren die humanen DNA-Polymerasen diese Verbindungen nicht als Substrate.

Diese Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass eventuell bereits aufgrund ihrer cytotoxischen Eigenschaften aussortierte antiviral aktive Nucleoside wieder als potentielle Propharmaka in Studien aufgenommen werden sollten.

Ein weiterer bedeutender Vorteil der einfachmaskierten Triphosphatverbindungen ist, dass diese im Vergleich zu herkömmlichen Triphosphaten eine stark erhöhte Stabilität im Cytoplasma aufweisen, da diese keinem enzymatischen Abbau von Phosphatasen unterliegen. So konnte über einen Zeitraum von 21 Stunden keine Degeneration der γ -monoveresterten Verbindung **26** festgestellt werden, wodurch toxische Nebenwirkungen, ausgehend von den im Abbauprozess entstehenden, weniger phosphorylierten Metaboliten (s. AZT-MP **78**), minimiert werden können.

6.3 Beiträge zur Etablierung eines Synthesezugangs zu carbocyclischen 2'-Fluor-modifizierten-L-Nucleosiden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit galt es, neben weiteren Beiträgen zur Darstellung des carbocyclischen 2'-modifizierten-L-Nucleosids *carba*-L-FMAU **27**, einen effizienten Zugang zu dem Alkohol **92** zu realisieren.

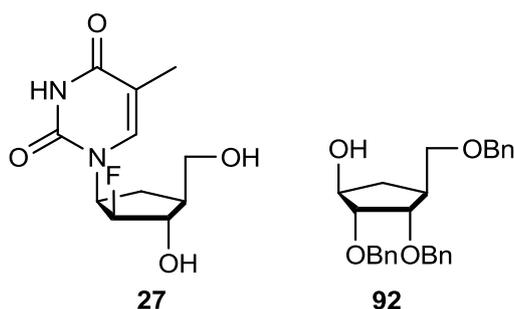


Abbildung 90: Darstellung des 2'-modifizierten-L-Nucleosids *carba*-L-FMAU **27** und des bezylgeschützten Alkohols **92**.

6.3.1 Beiträge zur Darstellung von *carba*-L-FMAU **27**

Zur Gruppe der carbocyclischen 2'-modifizierten-L-Nucleosiden zählt unter anderem das bereits erwähnte *carba*-L-FMAU **27**. Abgeleitet wird dieses Nucleosid von dem ehemals zur Therapie von Hepatitis B eingesetzten Wirkstoff L-FMAU **93**, der 2006 in Südkorea unter dem Namen Levovir[®] zur Behandlung gegen Hepatitis B zugelassen wurde.^[132] Allerdings traten bei Verabreichung des Medikaments über einen längeren Zeitraum gravierende Nebenwirkungen, wie Myopathie, auf, weshalb es aufgrund seiner Toxizität keine therapeutische Anwendung mehr findet.^[133,134]

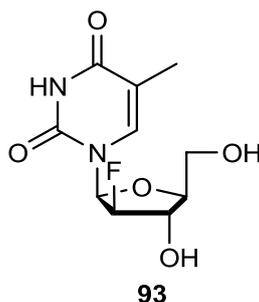


Abbildung 91: Der ehemals zugelassene Wirkstoff L-FMAU **93**.

Trotz der bekannten Cytotoxizität ist der Wirkmechanismus dieses 2'-modifizierten Nucleosids **93** weiterhin von großem Interesse. In vorangegangenen Studien konnte festgestellt werden, dass L-FMAU-TP **94** eine Inhibierung der DNA-Synthese bewirkt, ohne dabei selbst in den DNA Strang eingebaut zu werden. Demnach fungiert Triphosphat **94** während der DNA-Synthese nicht als sogenannter *chain terminator*, sondern als kompetitiver Inhibitor der Polymerase.^[135,136]

Um den Wirkmechanismus von *carba*-L-FMAU **27** aufzuklären, wurden, basierend auf der Kristallstruktur des Triphosphats **94** und der Simulation des aktiven Zentrums der HBV-Polymerase, mechanistische Untersuchungen durchgeführt. Dabei konnte bestätigt werden, dass in Anwesenheit von L-FMAU-TP **94** die DNA im katalytischen Zentrum des entsprechenden Enzyms überwiegend in einer B-DNA-Form vorliegt.^[136]

Widererwartend konnte in dieser Studie jedoch ebenfalls beobachtet werden, dass nahe des katalytischen Zentrums der Polymerase die DNA eine A-Form-ähnliche Konformation einnimmt. Für die Elongation der DNA ist jedoch nicht nur die Form der DNA entscheidend, sondern auch die Konformation der einzubauenden Nucleotide. Um in die entsprechende DNA-Form eingebaut zu werden, müssen die Nucleotide in *southern*- (für B-DNA) oder *northern*- (für A-DNA) Konformation vorliegen.^[135,136]

Die Kristallstruktur von L-FMAUTP **94** aus der *Cambridge Structural Database* zeigt, dass dieses Triphosphat, bedingt durch die elektronenziehenden Gruppen an der 2'/3'-Position, in der *southern*-Konformation vorliegt und somit für den Einbau in die beschriebene, A-ähnlichen DNA-Form im aktiven Zentrum der Polymerase nicht zur Verfügung steht. Dies impliziert, dass das Triphosphat **94** bei der HBV-DNA-Synthese nicht als Substrat für die Polymerase dienen kann.^[135,136] Genauer zeigen diese Berechnungen, dass die vorliegende Konformation des L-FMAU-Triphosphats **94** aufgrund des aromatischen Ring der Aminosäure Phe 436 zu einer sterischen Hinderung des aktiven Zentrums des Enzyms führt (Abbildung 92).

Dementsprechend liegt das katalytische Zentrum der Polymerase blockiert vor, was folglich zu einer Inhibierung der HBV-DNA-Synthese führt.^[135,136]

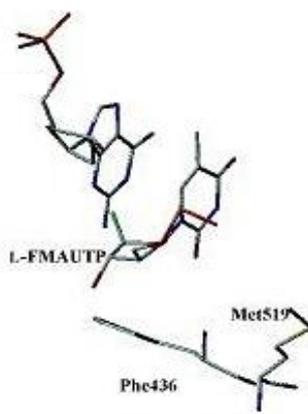


Abbildung 92: *Molecular Dynamics* Simulation der HBV-Polymerase mit L-FMAU-TP **94**.^[135,136]

Wie bereits in Kapitel 4 diskutiert, unterscheiden sich carbocyclische Verbindungen in ihrer Struktur, Flexibilität und Reaktivität gegenüber den natürlichen Nucleosiden sowie deren glycosidischen Analoga. Die Motivation carbocyclische 2'-modifizierte-Nucleoside darzustellen, basiert auf dem Postulat, dass unter Beibehalt der antiviralen Aktivität die Toxizität im Vergleich zu den glycosidischen Analoga signifikant vermindert wird.

1987 stellte BIGGADIKE eine lineare Synthesestrategie für das racemische *carba*-FMAU vor.^[137] Um jedoch einen effizienten Zugang zu dieser Verbindungsklasse zu etablieren, ist die Entwicklung einer konvergenten Synthesestrategie wünschenswert. Im Gegensatz zu dem linearen Ansatz ist hierbei ein großes Maß an Flexibilität gegeben. Durch die Kupplung des entsprechenden Vorläufermoleküls mit unterschiedlichen Nucleobasen kann mit Hilfe einer konvergenten Herangehensweise eine große Bibliothek an Zielmolekülen generiert werden.

Bei der Konzeptionierung einer konvergenten Syntheseroute zur Darstellung von *carba*-L-FMAU **27** ist der Zeitpunkt der Fluoreinführung einer der wichtigsten Aspekte. Aus einer Vielzahl von Literaturbeispielen ist bekannt, dass die Fluorierung an der gewünschten Position nach dem Aufbau des Nucleosidgerüsts möglich ist.^[138] Optional kann die Fluorierung allerdings auch bereits auf Ebene der Vorläufermoleküle realisiert werden.^[138,139] Um ein geeignetes Synthesekonzept zur Darstellung von *carba*-L-FMAU **27** zu liefern, wurden beide Varianten erprobt.

6.3.2 Versuch der Darstellung von *carba*-L-FMAU **27** über die Fluorierung eines Nucleosids

Zur Entwicklung einer Syntheseroute, bei der die Fluorierung am Nucleosid **95** erfolgt, wurde das linear dargestellte Vorläufermolekül **96** von BIGGADIKE als Vorlage herangezogen.^[139] Zur Übertragung der Synthesebedingungen von der Verbindung **96** auf das Nucleosid **95** wurden folgende Vereinfachungen angenommen (Abbildung 93):

- Die Nucleobase des Nucleosids **95** (Abbildung 93, rechte Seite R¹) weist ähnliche sterische Einflüsse wie der DNP-Rest der Verbindung **96** (R¹) auf. Auf eine Berücksichtigung elektronischer Einflüsse wurde an dieser Stelle verzichtet, da in der Literatur Beispiele vorhanden sind, die eine Fluorierung an beiden Molekülen unter selben Reaktionsbedingungen erlaubt.^[138,139]
- Die Silyl-Schutzgruppe des Nucleosids **95** verhält sich vergleichbar wie diejenige des Vorläufermoleküls **96**.

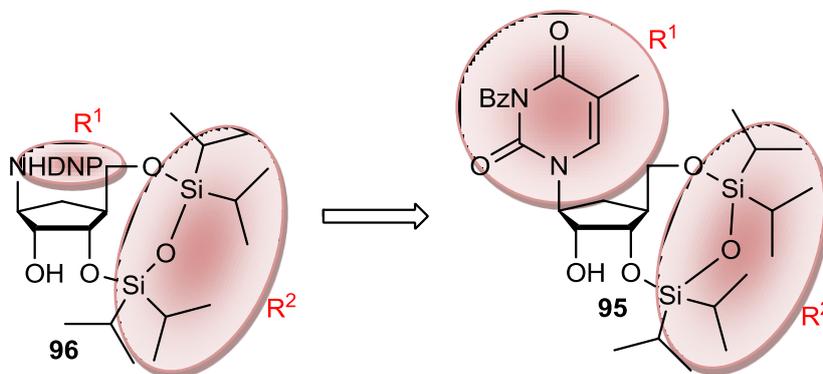


Abbildung 93: Getroffene Annahmen zur Fluoreinführung auf Nucleosidebene.

Basierend auf diesen Annahmen sollte *carba*-L-FMAU **27** in einer mehrstufigen Sequenz hergestellt werden. In Analogie zu SÖNKE JESSEL sollte in einer mehrstufigen Sequenz über eine Alkylierungsreaktion von Natriumcyclopentadienid **23** das benzoylgeschützte L-*carba*-d4T **97** hergestellt werden.^[94] Durch anschließende Bishydroxylierung und Silylierung galt es, das zu fluorierende Nucleosid zu erhalten. Nach der Fluorierung sowie der Entfernung der Schutzgruppen sollte schließlich das gewünschte Produkt **27** erhalten werden. Das entsprechende Retrosyntheschema ist in Abbildung 94 gezeigt.

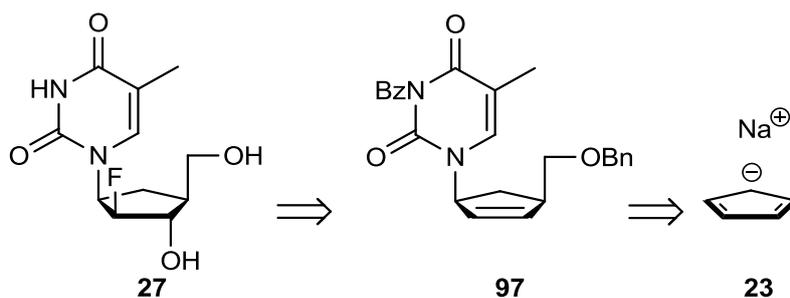


Abbildung 94: Retrosyntheseschema zur Darstellung von *carba*-L-FMAU **27** ausgehend von Natriumcyclopentadienid **23**.

Der erste Schritt in der Synthesesequenz erfolgte analog zur Darstellung des D-Vorläufermoleküls **29**.^[94,95,96,97] Durch eine Alkylierungsreaktion und eine sich direkt anschließende stereoselektive Hydroborierung konnte das Cyclopentanol L-**29** nach wiederholter säulenchromatographischer Reinigung in einer guten Ausbeute von 41% isoliert werden.

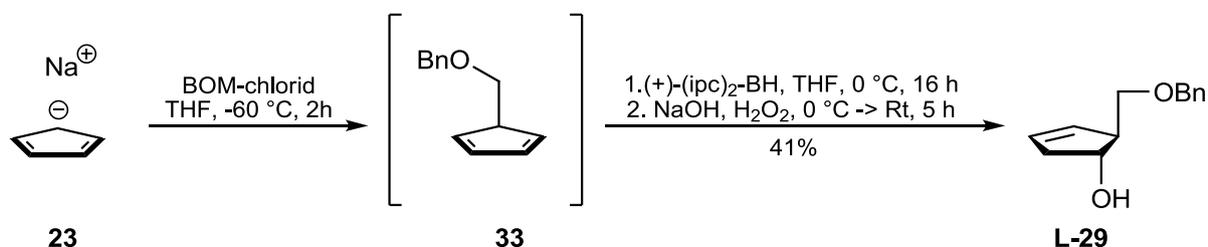


Abbildung 95: Darstellung des Cyclopentenols L-**29** ausgehend von Natriumcyclopentadienid **23**.

Im Folgenden wurde die Hydroxylfunktion des Cyclopentenols L-**29** mit einer Mesylgruppe blockiert. Die Einführung dieser funktionellen Gruppe diente dazu, die Hydroxylfunktion für die im späteren Syntheseverlauf stattfindende Eliminierung in eine gute Abgangsgruppe zu überführen. Für die Synthese des Mesylats **98** wurde das Cyclopentanol L-**29** unter Kühlung und unter Nutzung von Triethylamin als Base mit Methansulfonylchlorid umgesetzt. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung konnte das Mesylat **98** in einer sehr guten Ausbeute von 91% isoliert werden.

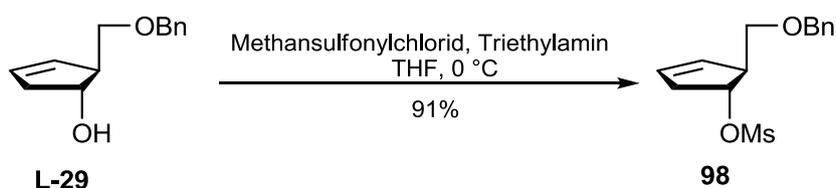


Abbildung 96: Mesylierung des Cyclopentenols L-**29**.

Ein grundlegender Reaktionsschritt in dem angestrebten Synthesepfad ist die stereoselektive Einführung einer Hydroxylgruppe. Wie bereits in Kapitel 6.1 diskutiert, konnte OLAF LUDEK in Vorarbeiten eine stereoselektive Hydroborierung des benzylgeschützten Alkohols **30** unter Verwendung des Reagenzes 9-BBN erzielen.^[100,140] Die Übertragung und Optimierung der Reaktionsbedingungen auf das mesylgeschützte Derivat **98** konnte durch SÖNKE JESSEL realisiert werden.^[94]

Analog zu diesen optimierten Reaktionsbedingungen erfolgte bei 0 °C die Umsetzung des Mesylats **98** mit dem sterisch anspruchsvollen Hydroborierungsreagenz 9-BBN. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt, wobei die Bildung von drei Nebenprodukten beobachtet werden konnte. Es wurde auf eine Isolierung der Nebenprodukte verzichtet, da es sich, wie von SÖNKE JESSEL beschrieben, aller Voraussicht nach um die Eliminierungsprodukte **99** und **100** sowie das Regioisomer **101** handelte (Abbildung 97).^[94]

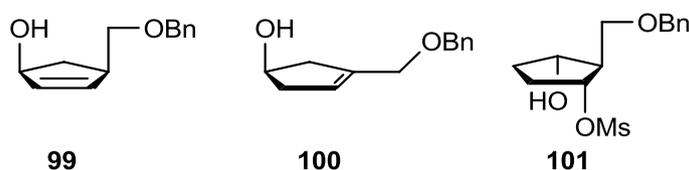


Abbildung 97: Beschriebene Nebenprodukte nach SÖNKE JESSEL.^[94]

Nach der Reinigung des Rohproduktes konnte das Cyclopentanol **102** in einer moderaten Ausbeute von 40% gewonnen werden. Diese Ausbeute beruht auf der signifikanten Bildung der genannten Nebenprodukte. Zudem wiesen die gebildeten Nebenprodukte und das Zielmolekül ähnliche R_f -Werte auf, wodurch die säulenchromatographische Reinigung des Produktes **102** deutlich erschwert wurde und in diesem Zuge Ausbeuteverluste zu verzeichnen waren.

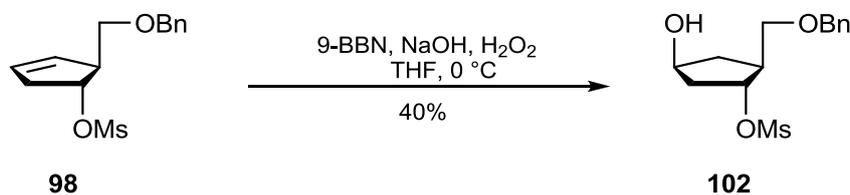


Abbildung 98: Hydroborierung des Cyclopentens **98**.

Anschließend sollte zwischen der C-1- und der C-5-Position des Cyclopentanol **102** durch eine Eliminierung der Mesylgruppe eine Doppelbindung generiert werden. Für die Eliminierung wurde Kalium-*tert*-butylat als Base und DMF als Lösungsmittel eingesetzt.

Diese Reaktionsbedingungen basieren ebenfalls auf der Arbeit von SÖNKE JESSEL, der unterschiedliche Basen und Lösungsmittel zur Eliminierung der Mesylgruppe untersucht hatte.^[94] Die schließlich optimierten Reaktionsparameter erlaubten es ihm, das Hoffmann-Produkt in einer sehr guten Ausbeute von 82% zu isolieren.^[94]

Analog zu seinem Syntheseprotokoll wurde das Cyclopentanol **102** in DMF gelöst und mit Kalium-*tert*-butylat versetzt. Nach Zugabe der Reagenzien wurde die Reaktionslösung für 20 min bei 120 °C gerührt, wobei der Reaktionsfortschritt dünnenschichtchromatographisch kontrolliert wurde. Dabei konnte die Bildung von Nebenprodukten beobachtet werden. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde das gewünschte Hoffmann-Produkt **103** reproduzierbar mit einer Ausbeute von etwa 50% erhalten, womit dieser Wert merklich unterhalb der Literaturangabe lag.

Aufgrund ähnlicher Ergebnisse wurden von SIMON WEISING weitere Untersuchungen vorgenommen. Durch die Änderung der Äquivalente an Base, Reaktionstemperatur und Reaktionszeit sollte die Ausbeute erhöht werden. Allerdings konnte durch die Veränderung der Reaktionsparameter keine Verbesserung der Ausbeute erzielt, sodass nahezu durchgehend Ausbeuten von 50% erhalten wurden.^[141]

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit evaluiert, ob sich durch die Verwendung einer TBDMS-Schutzgruppe eine verbesserte Umsetzung erwirken lässt. Die Untersuchung erfolgte unter der Annahme, dass von der freien Hydroxylgruppe des Mesylats **102** ein wesentlicher Einfluss auf die Bildung der zahlreichen Nebenprodukte ausgeht, da es sich dabei um die einzige ungeschützte funktionelle Gruppe des Moleküls **102** handelt. Durch die Blockierung der freien Hydroxylgruppe mit der TBDMS-Schutzgruppe sollte die Bildung der Nebenprodukte minimiert werden und auf diese Weise zu einer verbesserten Ausbeute führen.

Um die Hydroxylfunktion mit einer Silylschutzgruppe zu blockieren, wurde das Mesylat **102** in einer Reaktion mit Imidazol und *tert*-Butyldimethylsilylchlorid umgesetzt. Nach einer säulenchromatographischen Reinigung konnte das Produkt **104** leicht verunreinigt in einer Ausbeute von 89% erhalten werden.

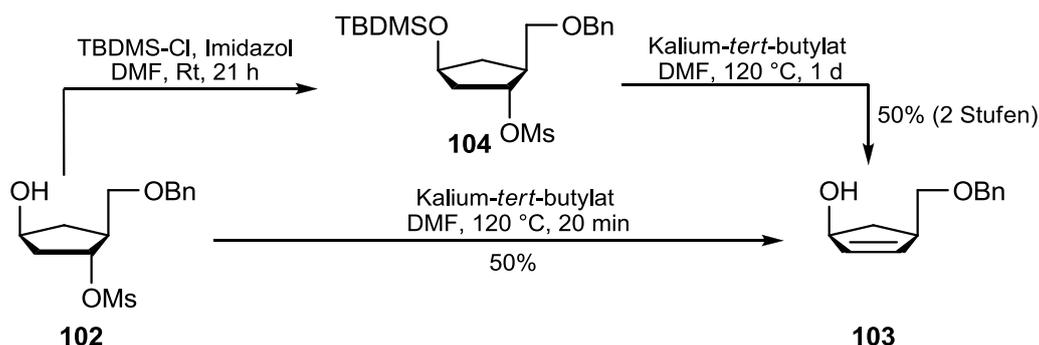


Abbildung 99: Darstellung des Cyclopentenols **103** ausgehend von dem Mesylat **102** über zwei Synthesewege.

Nach einer Vorschrift von NEGRÓN sollten ausgehend von der Verbindung **104** gleichzeitig die Eliminierung der Mesylgruppe und die Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppe erfolgen.^[142] Dazu wurde das TBDMS-geschützte Mesylat **104** in DMF gelöst und mit Kalium-*tert*-butylat bei Raumtemperatur versetzt. Nach der Reinigung des Rohproduktes konnte zwar das gewünschte Hoffmann-Produkt **103** erhalten werden, allerdings betrug die Ausbeute wie bei den vorherigen Versuchen lediglich 50%. Zusätzlich zeigten sich in der dünnschichtchromatographischen Reaktionsverfolgung zahlreiche Nebenprodukte, deren säulenchromatographische Trennung aufgrund der ähnlichen R_f -Werte jedoch nicht durchgeführt wurde. Somit konnte die Ausbeute der Eliminierungsreaktion zur Darstellung des Cyclopentenols **103** durch Einführung einer Silylschutzgruppe nicht gesteigert werden. Es ist zu vermuten, dass nach der Methode von NEGRÓN zunächst die Abspaltung der TBDMS-Schutzgruppe erfolgt, bevor die Mesylat-Gruppe eliminiert wird. Das würde bedeuten, dass analog zu der Vorschrift von SÖNKE JESSEL wieder die freie Hydroxylfunktion im System vorliegt und dadurch erneut die Bildung der bekannten Nebenprodukte ermöglicht wird.^[94] Dieser Umstand würde die wiederholt moderate Ausbeute von 50% erklären.

Im Folgenden musste zur Darstellung der Verbindung **105** zunächst eine Inversion der Hydroxylfunktion an der C-1-Position vorgenommen werden. Die Inversion konnte durch Anwendung einer Mitsunobu-Reaktion durchgeführt werden.^[99] Entsprechend dem in Kapitel 6.1 beschriebenen Mechanismus wurden zunächst die Reagenzien Triphenylphosphin **36** und DIAD **37** zu dem Komplex **38** umgesetzt. Dieser Komplex wurde anschließend langsam zu einer Lösung aus Cyclopentenol **103** und Benzoesäure in Diethylether bei 0 °C getropft. Der Ansatz wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Vor der Hydrolyse der Benzoatgruppe der Verbindung **106** wurde eine grobe säulenchromatographische Reinigung vorgenommen, um den schwer abtrennbaren DIAD-Komplex im späteren Syntheseverlauf zu vermeiden.

Nach der Hydrolyse der Benzoatgruppe und einer säulenchromatographischen Reinigung konnte das Cyclopentenol **105** in einer Ausbeute von 84% erhalten werden.

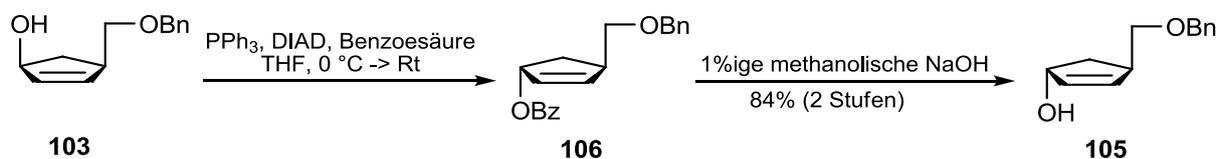


Abbildung 100: Inversion der Hydroxyfunktion des Cyclopentenols **103** unter Mitsunobu-Bedingungen.

Die Verbindung **105** wurde im Anschluss mittels einer Mitsunobu-Kupplung zu dem gewünschten Nucleosid **97** umgesetzt. Hierfür wurde das Cyclopentenol **105** zusammen mit *N*3-Benzoylthymin in Acetonitril mit einem vorgebildeten Komplex aus DIAD und Triphenylphosphin bei $-40\text{ }^\circ\text{C}$ versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt.

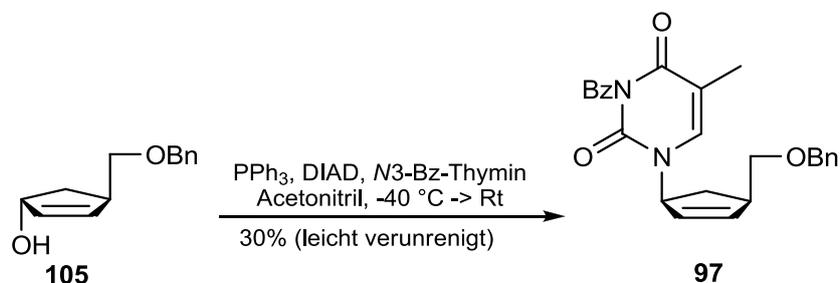


Abbildung 100: Darstellung des Nucleosids **97** unter Mitsunobu-Bedingungen.

Nach mehrmaliger säulenchromatographischer Reinigung konnte das Nucleosid **97** mit leichten Verunreinigungen in einer Ausbeute von 30% erhalten werden, wobei die Ausbeute der dünnschichtchromatographisch beobachteten Nebenprodukte nicht bestimmt wurde.

Aus dem erhaltenen Produkt **97** sollte, neben den DIAD-Verunreinigungen, im weiteren Syntheseverlauf auch das O^2 -gekuppelte Nucleosid abgetrennt werden. Auf die Abspaltung der Benzoylgruppe an der Nucleobase wurde verzichtet, um unerwünschte Nebenreaktionen bei den Folgereaktionen zu vermeiden.

Eine Abspaltung der Benzoylschutzgruppe an der Nucleobase hätte im späteren Syntheseverlauf zur Folge, dass bei der angestrebten Fluorsubstitution an der C-2'-Position der intramolekulare Angriff des Carbonylsauerstoffs gegenüber der Substitution durch das Fluoridanion (gestrichelte Linie, Abbildung 101) begünstigt wäre. Bei einem intramolekularen Angriff des Carbonylsauerstoffs würde es im ersten Schritt (Schritt 1, Abbildung 101) zu einem Ringschluss kommen.

Im Folgenden würde nun das Fluoridion jedoch aus sterischen Gründen aus dem unteren Halbraum an der C-2'-Position nucleophil angreifen und dadurch den Ring wieder öffnen (Schritt 2, Abbildung 101). In der Folge wäre die Fluoreinführung zwar erfolgreich, das Fluoratom befände sich jedoch in *down*-Stellung, statt wie gewünscht in *up*-Stellung.^[143]

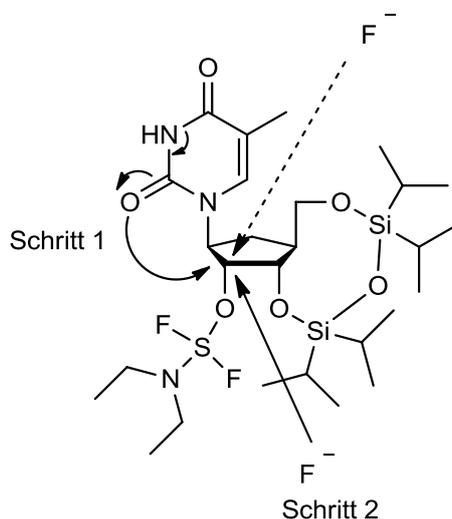
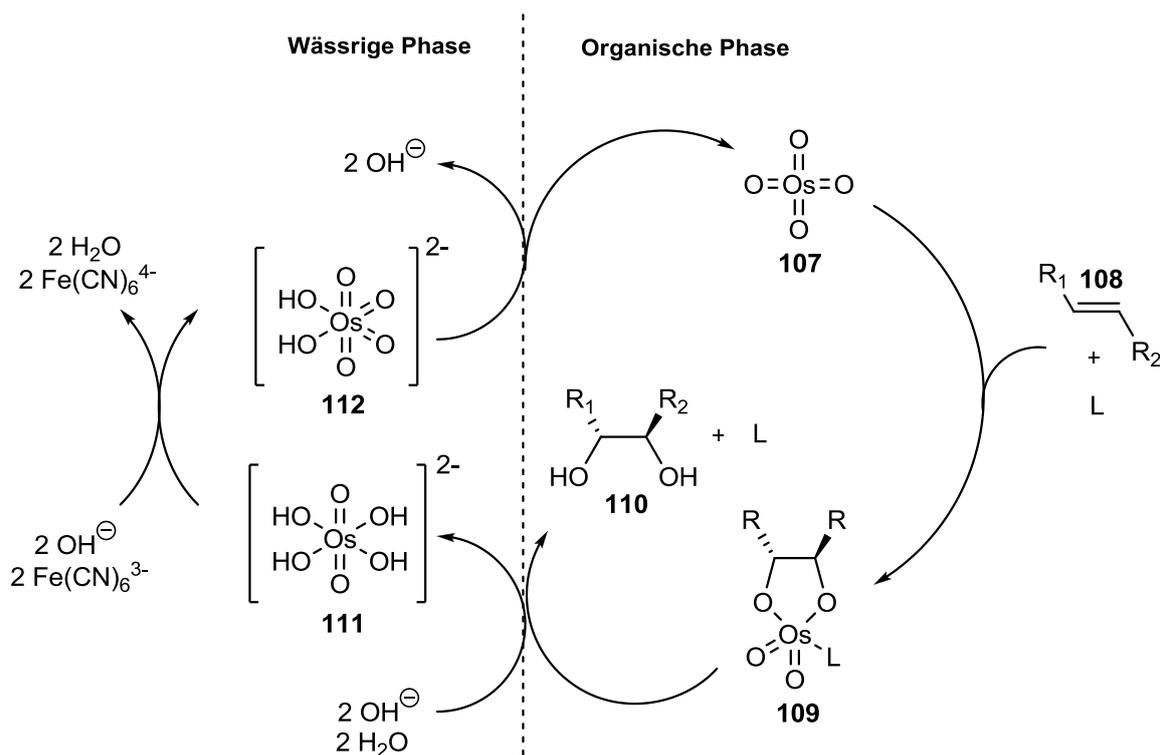
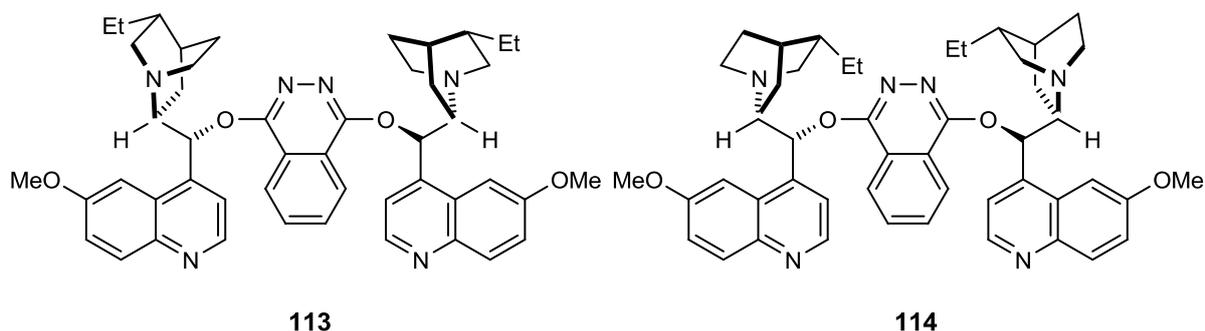


Abbildung 101: Darstellung der Fluoreinführung in *down*-Stellung an der C-2'-Position bei Vorliegen einer ungeschützten Nucleobase in Anwesenheit von DAST.

Die Einführung der *cis*-ständigen Hydroxylgruppen erfolgte über die asymmetrische Bishydroxylierung nach SHARPLESS.^[144,145,146] Der gezeigte Katalysecyclus basiert auf einem Zwei-Phasen-System und ist in Abbildung 102 skizziert. Zunächst bildet sich in der organischen Phase aus Osmiumtetroxid **107**, einem Liganden und dem Alken **108** durch eine [3+2]-Cycloaddition das Osmiumoxid-Liganden-Intermediat **109**. Die Freisetzung des *cis*-ständigen Diols **110** und des freien Liganden erfolgt durch Hydrolyse an der Phasengrenze. Das dabei entstehende reduzierte Osmat **111** geht in die wässrige Phase über, wo es von Hydroxydionen und dem Cooxidationsmittel Hexacyanoferrat(III) wieder zu Osmiumtetroxid **107** oxidiert wird. Nach Regenerierung des Bishydroxylierungsmittels erfolgt die Diffusion in die organische Phase, wo es der Katalyse erneut zur Verfügung steht.^[146]


 Abbildung 102: Katalysezyklus der Zwei-Phasen-Synthese nach SHARPLESS.^[146]

Für solche enantioselektiven Reaktionen werden unter anderem diastereomorphe Alkaloide, wie das (DHQ)₂-PHAL **113** oder das (DHQD)₂-PHAL **114**, als Liganden eingesetzt. Diese Liganden finden sich in den kommerziell erhältlichen Bishydroxylierungs-Reagenzmischungen AD-Mix α und β wieder, die aus etwa 0.002 Äquivalenten Kaliumtetrahydrodioxoosmat und jeweils 3.0 Äquivalenten Kaliumhexacyanoferrat(III) und Kaliumcarbonat bestehen.^[145]


 Abbildung 103: Liganden der asymmetrischen Bishydroxylierung nach SHARPLESS.^[145]

Durch eine solche asymmetrische Bishydroxylierung sollte in der vorliegenden Arbeit das Nucleosid **97** zum Diol **115** umgesetzt werden.

Dazu wurde sich an den Reaktionsbedingungen zur Darstellung von L-carba-Ribothymidin **115** nach SÖNKE JESSEL orientiert, indem das Reagenz AD-Mix α verwendet wurde.^[94] Zusammen mit diesem Reagenz wurde das Nucleosid **97** in einem Gemisch aus *tert*-Butanol und Wasser (2:1) und einem Äquivalent Methansulfonamid zur Reaktion gebracht.

Aufgrund der Ergebnisse von SÖNKE JESSEL wurde davon ausgegangen, dass die Bildung des Diols **115** gegenüber dem Diol **116** bevorzugt wird, da die sterisch anspruchsvolle Nucleobase den oberen Halbraum abschirmt.

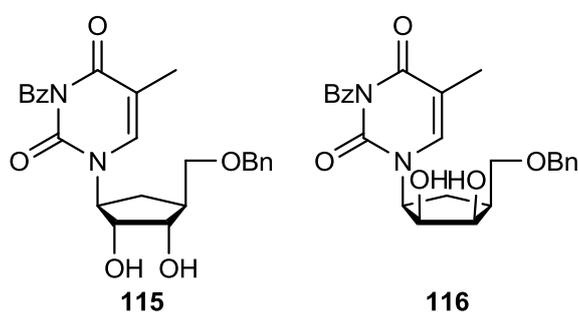


Abbildung 104: Strukturen der Diastereomere **115** und **116**.

Nach Durchführung der asymmetrischen Bishydroxylierung wurde der Reaktionsansatz säulenchromatographisch gereinigt. Dabei zeigte sich, dass sowohl das Produkt **115** als auch das Nucleosid **116** vorlagen, wobei jedoch nicht ermittelt werden konnte, welches der beiden Nucleoside das Hauptprodukt der Ausbeute (47%) darstellte. Aufgrund der ähnlichen Retentionszeiten gelang es auch nach mehrmaliger Säulenchromatographie nicht, die Moleküle **115** und **116** vollständig voneinander zu trennen. Aus diesem Grund wird in der Folge das Reaktionsprodukt stellvertretend als Nucleosid **117** bezeichnet.

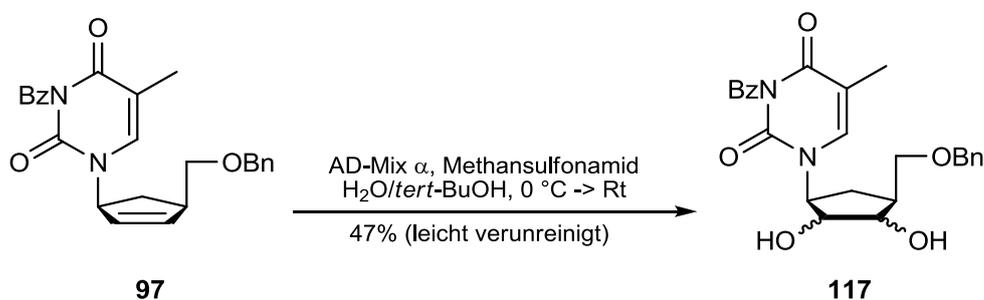


Abbildung 105: Bishydroxylierung nach SHARPLESS.^[144,145,146]

Die Konfiguration der generierten Hydroxylgruppen konnte mittels Aufnahme eines NOESY-Spektrums auf dieser Stufe nicht eindeutig bestätigt werden. In dem NOESY-Spektrum des Produktes **115** oder **116** sind deutlich intensive Kopplungen von $H-1'$ zu $H-2'$, $H-3'$ zu $H-4'$ oder $H-6'a/b$ zu erkennen. Eine genaue Zuordnung von $H-4'$ und $H-6'a/b$ kann nicht erfolgen, da sich die entsprechenden Signale überlagern.

Aufgrunddessen kann somit auch die Konfiguration der $H-2'$ und $H-3'$ -Protonen zu $H-4'$ nicht eindeutig ermittelt werden. Wie bereits in Kapitel 4.5 beschrieben, können carbocyclische Nucleoside, bedingt durch ihre Flexibilität in der cyclischen Struktur, Konformationen einnehmen, die eine intensive Kopplung von $H-1'$ zu $H-2'$ zulassen. Das bedeutet, dass an dieser Stelle keine eindeutige Aussage zur Konfiguration getroffen werden kann. Daher wurde folgend bis zur eindeutigen Klärung der Konfiguration von der Bildung des gewünschten Produkts ausgegangen. Die Bestimmung der Konfiguration sollte im weiteren Syntheseverlauf geklärt werden.

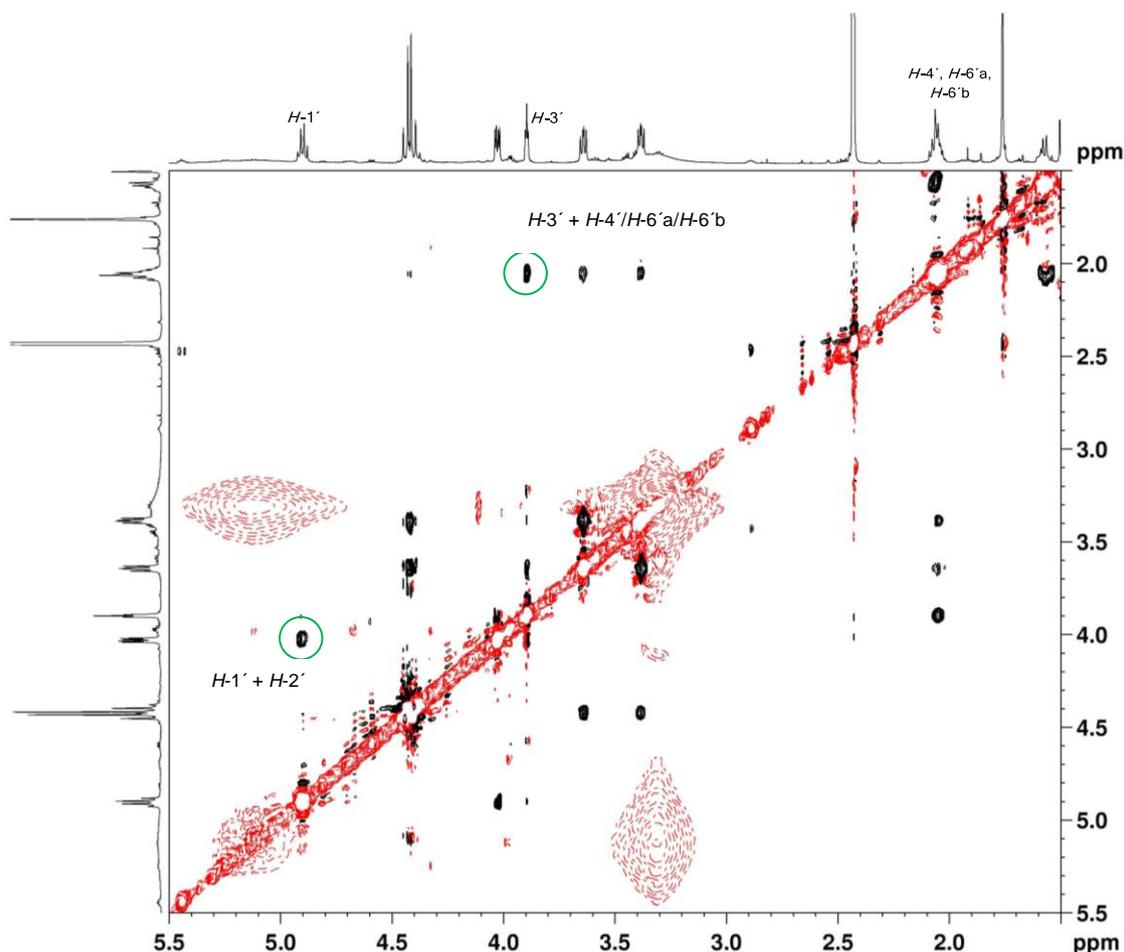


Abbildung 106: NOESY-Spektrum des vermeintlichen Produktes **115**.

Als Nächstes wurde die Abspaltung der Benzylgruppe durchgeführt, um im Anschluss eine Schützung der 3'- und 5'-Position vornehmen zu können. Dazu wurde das Nucleosid **117** in Methanol gelöst und zusammen mit dem Hydrierkatalysator Palladium unter Wasserstoffatmosphäre auf Aktivkohle gerührt (s. Abbildung 107).

Nach Filtration über Celite® konnte das Produkt **118** in einer Ausbeute von 82% dargestellt werden. An dieser Stelle wurde auf eine säulenchromatographische Reinigung verzichtet, da aus Vorarbeiten mit dem carbocyclischen Nucleosidanalogen *D-carba*-dT **16** bereits bekannt war, dass die hohe Polarität des Moleküls Eluenten mit einer ebenfalls hohen Polarität benötigen würde.^[98] So wird für eine erfolgreiche säulenchromatographische Reinigung ein Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan/Methanol im Verhältnis von 9:1 empfohlen.^[98] Da die enthaltenen Verbindungen jedoch bei diesem Mischungsverhältnis sehr ähnliche Retentionszeiten aufwiesen, erschien eine Reinigung mittels Chromatographie nicht zielführend, weshalb im Folgenden das Triol **118** als Rohprodukt eingesetzt wurde.

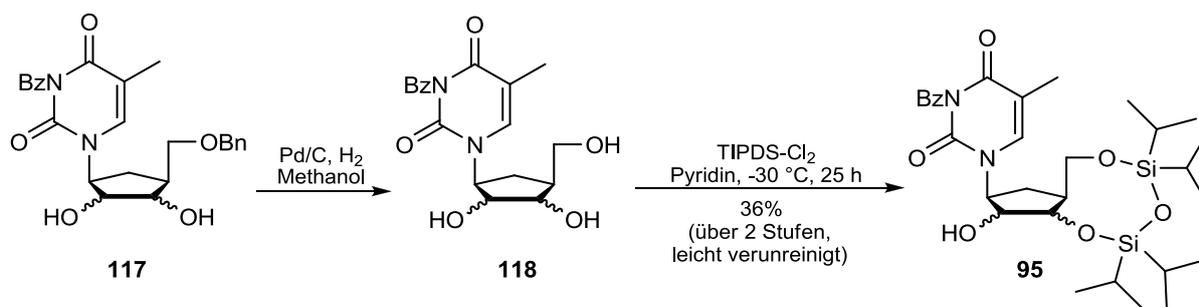


Abbildung 107: Debenzylierung und 3'-5'-Blockierung mit der *Markiewicz*-Gruppe.

Die vorliegenden Hydroxylfunktionen an der 3'- und 5'-Position der Verbindung **118** sollten darauffolgend mit dem *Markiewicz*-Reagenz 1,3-Dichloro-1,1,3,3-Tetraisopropyldisiloxan (TIPDS-Cl₂) geschützt werden.^[147] Die Prozedur der Einführung von „Silylklammern“ hat sich in der Nucleosidchemie bewährt, um selektive Reaktionen am C-2'-Atom durchführen zu können (s. Abbildung 107).

Dazu wurde das gelöste Triol **118** bei -30 °C langsam mit dem Silylierungsreagenz versetzt. Nach 25 Stunden wurde die Reaktion durch Hydrolyse des Reagenzes beendet. Der Silylether **95** konnte mittels säulenchromatographischer Reinigung geringfügig verunreinigt in einer Ausbeute von 44% isoliert werden. Auf weitere Reinigungsschritte wurde aufgrund der geringen vorhandenen Substanzmengen im unteren Milligrammbereich verzichtet.

Da nun einzig die 2'-Hydroxylgruppe des Nucleosids **95** ungeschützt vorlag, konnte die Umsetzung in das 2'-fluormodifizierte Nucleosid **119** mit einem geeigneten Fluorierungsmittel erfolgen. Fluorierungsreagenzien sind zwar zur Spaltung von Silylethern bekannt, jedoch existieren diverse Literaturbeispiele, in denen silylgeschützte Alkohole erfolgreich in die entsprechenden Fluorderivate umgewandelt wurden.^[148]

Eines der dabei bevorzugt verwendeten Fluorierungsreagenzien ist Diethylaminoschwefel-trifluorid **120** (DAST). Wie in Abbildung 108 demonstriert, aktiviert DAST **120** unter Bildung des Intermediats **121** den Alkohol **122**, sodass *in situ* ein Fluoridanion angreift, sich eine Kohlenstoff-Fluor-Bindung ausbildet und das fluorierte Produkt **123** erhalten wird.^[94]

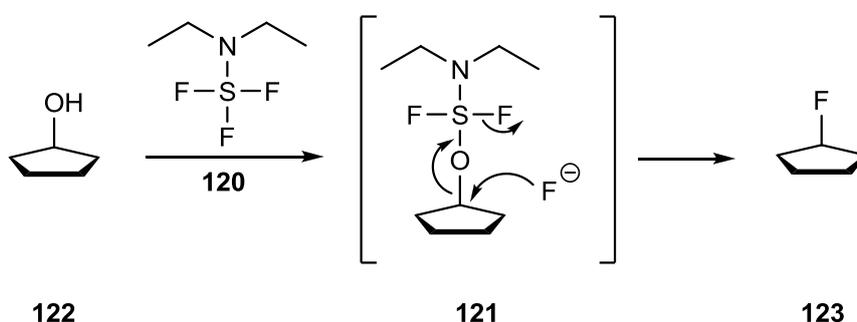
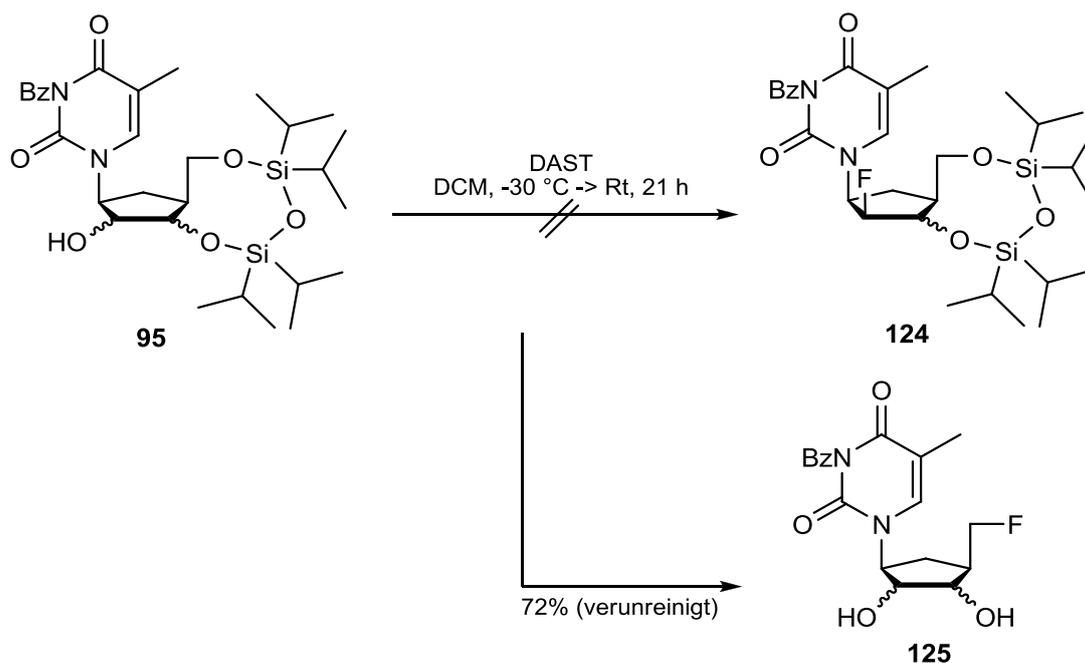


Abbildung 108: Mechanismus der Fluorierungsreaktion eines Alkohols unter Verwendung von DAST.^[94]

Dementsprechend sollte auch die Fluorierung des Nucleosids **95** mit DAST **120** durchgeführt werden. Dazu wurde das Nucleosid **95** in Dichlormethan gelöst und bei -30 °C mit dem Fluorierungsreagenz **120** versetzt. Nach Erwärmen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch für einen Tag gerührt. Die Zugabe von Kieselgel beendete schließlich die Reaktion.


 Abbildung 109: Fluorierung des geschützten Nucleosids **95**.

Die anschließende NMR-Analytik zeigte, dass die Fluorierung nicht an der 2'-Position erfolgte: Anstelle des gewünschten Produktes **124** wurden 72% des 5'-fluorierten Nucleosids **125** erhalten. Die genaue Bestimmung der Fluorierungsposition wurde durch NMR-Spektroskopie vorgenommen. Dem ^1H -NMR-Spektrum ist zu entnehmen, dass die Protonen an der C-5'-Position von **125** im Vergleich zum Edukt **95** tieffeldverschoben vorliegen (Abbildung 110). Nach der Fluorierungsreaktion ist eine Verschiebung von 3.78 ppm ($H\text{-}5'a$) bzw. 3.71 ppm ($H\text{-}5'b$) zu 4.64 ppm ($H\text{-}5'a$) bzw. 4.47 ppm ($H\text{-}5'b$) erkennbar. Vergleichbare chemische Verschiebungen wurden bereits für ähnliche 5'-F-Nucleoside publiziert.^[149] Ein weiterer Hinweis für die Einführung eines Fluoratoms an der 5'-Position zeigt sich bei Betrachtung der charakteristischen H-F-Kopplungskonstanten. Eine Fluoreinführung würde eine Kopplungskonstante von $^2J_{\text{H-F}} = \sim 50$ Hz bewirken. In dem vorliegenden Fall konnte eine Kopplungskonstante von 47.5 Hz für die benachbarten Protonen bestimmt werden.

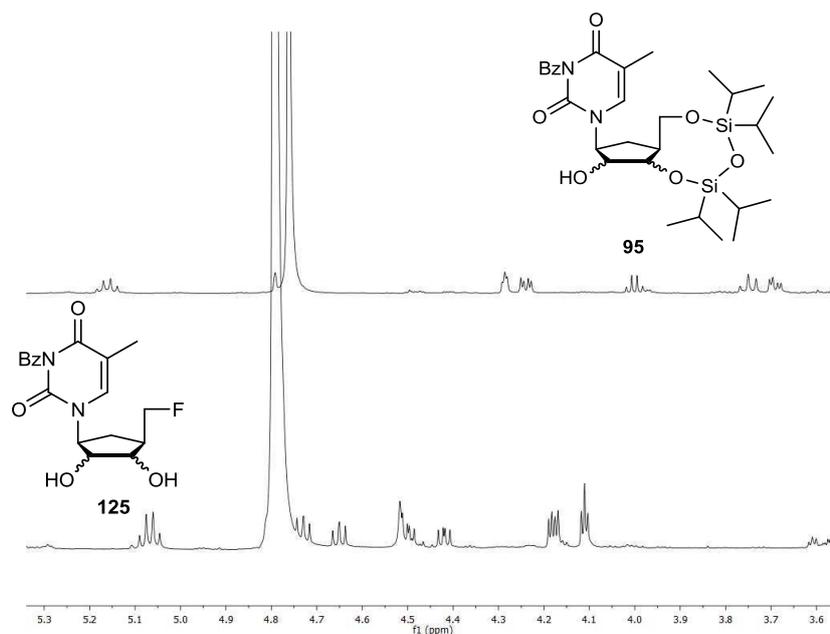


Abbildung 110: Übereinandergelegte ^1H -NMR-Spektren der Moleküle **125** und **95**.

Obwohl die Fluoreinführung an der nicht gewünschten Position erfolgte, sollte davon unabhängig durch Isolierung des Zielmoleküls **126** die Konfiguration der Hydroxylfunktionen aufgeklärt werden. Dazu wurde in der Synthesesequenz die Benzoylschutzgruppe an der Nucleobase mittels einer 1%igen methanolischen Natriumhydroxidlösung abgespalten, sodass das Diol **126** erhalten werden konnte (s. Abbildung 111).

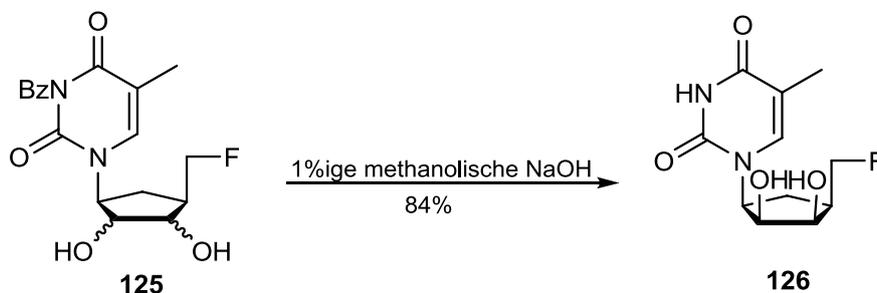


Abbildung 111: Darstellung des Diols **126**.

Nach der säulenchromatographischen Reinigung des Produkts **126** konnten durch NOESY-Spektroskopie die Konfigurationen der verbliebenen Hydroxylgruppen bestimmt werden. In dem in Abbildung 112 gezeigten NOESY-Spektrum sind eindeutig die Kopplungen von $H-1'$ und $H-2'$ sowie von $H-3'$ zu $H-4'$ und $H-6'a$ zu erkennen. Da bei der vorherigen Reaktion am Molekül **97** an der 2'- und 3'-Position mechanistisch eine *cis*-Bishydroxylierung abgelaufen ist, muss nun die $H-3'$ -Position im System konsequenterweise *cis*-ständig zu $H-2'$ vorliegen. Demzufolge ist die Kopplung zwischen dem $H-3'$ und dem Proton $H-4'$ und $H-6'a$ zuordenbar.

Dies lässt wiederum darauf schließen, dass es sich bei dem isolierten Produkt um das nicht gewünschte „up“-Diol **126** handelt. Allerdings wurde analog zu SÖNKE JESSEL bei der Bishydroxylierung des Diols **115** die Generierung des entsprechenden „down“-Diol erwartet. Eine Erklärung für dieses Phänomen kann an dieser Stelle nicht geliefert werden.

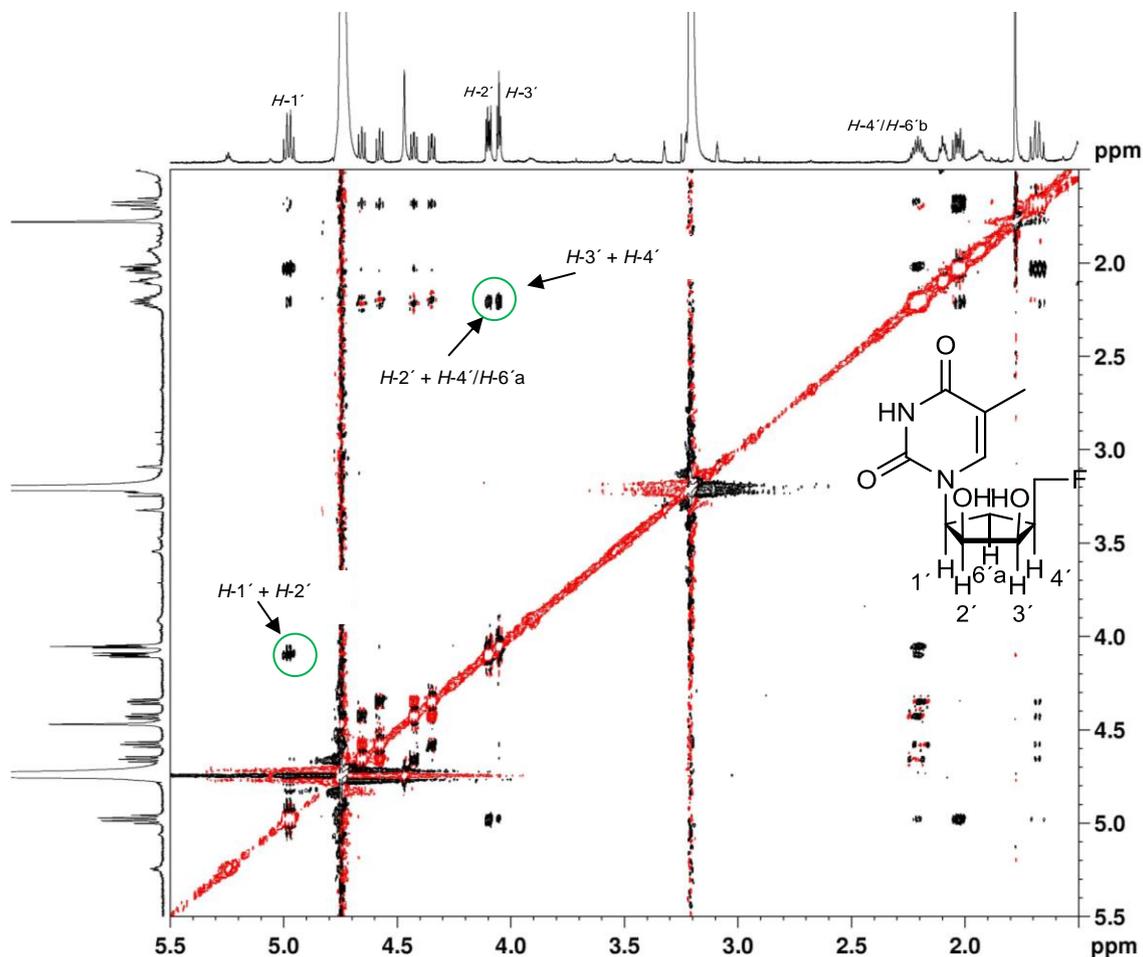


Abbildung 112: NOESY-Spektrum des Nucleosids **126**.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Darstellung von *carba*-L-FMAU **27** über die verwendete Syntheseroute nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte. Zum einen wurde anstelle des gewünschten „down“-Diols **115** das „up“-Diol **116** erhalten, zum anderen misslang die Einführung des Fluoratoms an der C-2'-Position. Folglich muss diese Syntheseroute primär hinsichtlich dieser beiden Punkte modifiziert werden. Des Weiteren sollte eine Erhöhung der Ausbeute des Eliminierungsproduktes **103** angestrebt sowie eine Verbesserung des Zugangs zu dem Nucleosid **97** vorgenommen werden, um diesen Syntheseansatz zur Darstellung von carbocyclischen 2'-modifizierten-Nucleosiden nutzbar zu machen.

6.3.3 Beiträge zur Synthese der 2'-fluorierten carbocyclischen Verbindung 128

Ein alternativer Syntheseansatz zur Darstellung von 2'-fluorierten carbocyclischen Verbindungen beruht auf der Einführung des Fluoratoms vor der Kupplung der Nucleobase. In Vorarbeiten unternahm SÖNKE JESSEL bereits Versuche, die Fluoreinführung an dem Vorläufermolekül **127** vorzunehmen (Abbildung 113).^[94] Die Bildung des Produktes **128** wurde dabei lediglich auf Basis dünnschichtchromatographischer Untersuchungen angenommen. Die Isolierung dieser Verbindung stellte sich zum damaligen Zeitpunkt als nicht möglich heraus, weshalb der endgültige Beweis einer tatsächlich erfolgreichen Fluorierung bisher nicht erbracht werden konnte.^[94] Nach der Aufarbeitung der Reaktion konnten lediglich Zersetzungsprodukte isoliert werden, zu denen unter anderem ein mögliches Eliminierungsprodukt zählte. Die Reaktionsaufarbeitung mit basischer Natriumhydrogencarbonatlösung begünstigte, bei entsprechender periplanarer Stellung des Fluorsubstituenten zu den *H*-1 oder *H*-3 Protonen, wahrscheinlich eine Eliminierungsreaktion.

Daher sollte das von SÖNKE JESSEL beschriebene Versuchsprotokoll im Rahmen dieser Arbeit weiterentwickelt werden, wobei es speziell die Darstellung und Isolierung der fluorierten Verbindung **128** zu realisieren galt.

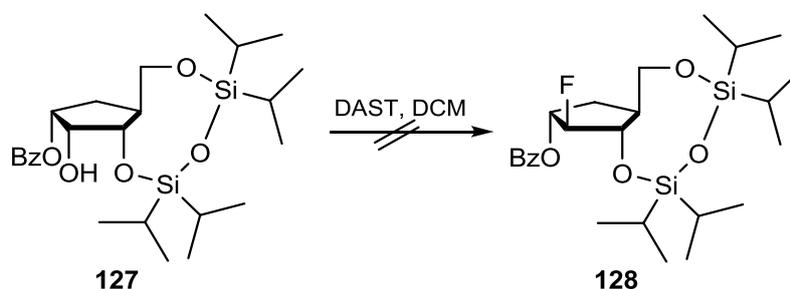


Abbildung 113: Versuch der Fluorierung der Verbindung **127**.^[94]

6.3.2.1 Optimierung der Fluorierungsbedingungen

Da weder die literaturbekannten Reaktionsbedingungen noch das Protokoll von SÖNKE JESSEL zur erfolgreichen Fluorierung der Verbindung **127** zum gewünschten Produkt **128** führten, wurden zunächst an der Modellverbindung **96** von BIGGADIKE die Reaktionsparameter für eine Fluorierungsreaktion optimiert.^[148] Dazu wurde die Modellverbindung **96** ausgehend vom Lactam **129** in einer mehrstufigen Synthesequenz generiert (Abbildung 114). Diese optimierten Reaktionsparameter sollten im Anschluss auf die entsprechende Verbindung **127** übertragen werden.

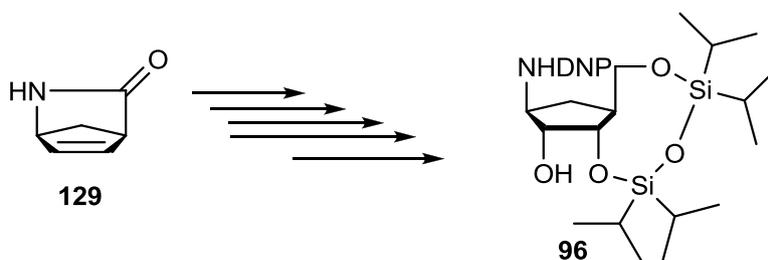


Abbildung 114: Mehrstufige Synthesesequenz zur Darstellung der Modellverbindung **96**.

Im ersten Schritt der Reaktionssequenz wurde dazu das Boc-geschützte (+)-Vince Lactam **130** aus dem Lactam **129** generiert. Die Reaktion erfolgte in Anlehnung an SINGH.^[150] Dabei wurde die Verbindung (+)-**129** durch Zugabe von Di-*tert*-butylcarbonat in einer Ausbeute von 94% zum Produkt **130** umgesetzt.

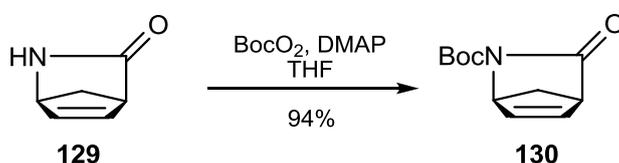
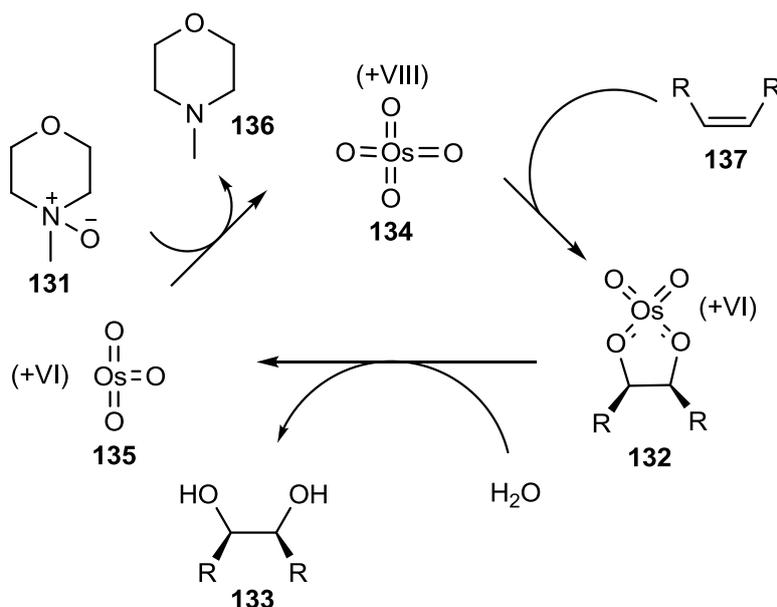
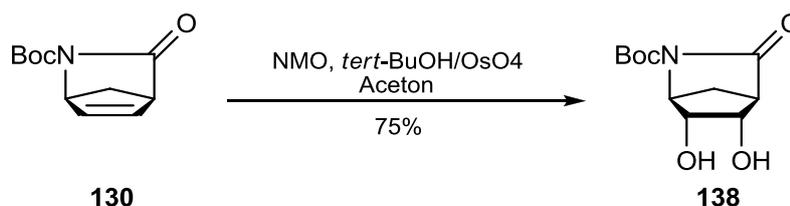


Abbildung 115: Darstellung der Boc-geschützten Verbindung **130**.

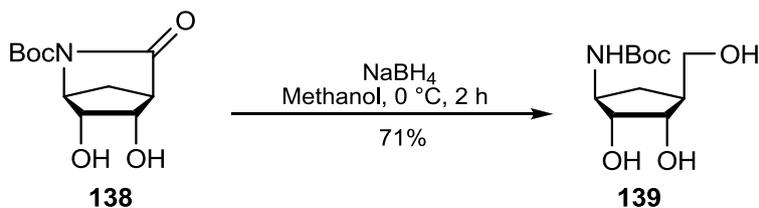
Für die anschließende Einführung der *cis*-ständigen Hydroxylgruppen an die Doppelbindung von der Boc-geschützten Verbindung (+)-**130** wurde die asymmetrische Bishydroxylierungsmethode von UPJOHN verwendet.^[151] Bei diesem Verfahren wird das Diol durch eine OsO_4 -katalysierte Oxidation mit *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid **131** eingeführt (Abbildung 116). In diesem Katalysezyklus bildet sich in einer Cycloaddition zunächst ein Osmium-Olefin-Komplex **132**, welcher durch Hydrolyse das *cis*-ständige Diol **133** freisetzt. Die Regeneration des Katalysators **134** erfolgt durch Verwendung des Cooxidationsmittels *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid **131**.


 Abbildung 116: Mechanismus der Bishydroxylierung nach UPJOHN.^[150]

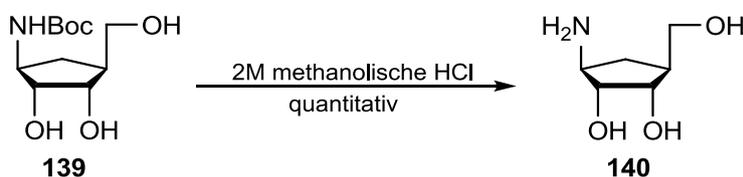
Die Reaktionsbedingungen der beschriebenen Bishydroxylierung der Doppelbindung wurden nach einer Vorschrift von SINGH durchgeführt.^[150] Dafür wurde das Boc-geschützte Derivat **130** in Aceton gelöst und bei 0 °C mit dem Cooxidans *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid sowie einem Gemisch aus *tert*-Butanol und wässriger OsO₄-Lösung (0.16 M) in einem Verhältnis von 2:1 versetzt. Die Reaktion wurde nach zwei Stunden durch Zugabe einer gesättigten Natriumhydrogensulfidlösung beendet. Unter diesen Reaktionsbedingungen konnte das thermodynamisch stabilere *exo*-Produkt **138** nach einer säulenchromatographischen Reinigung in einer Ausbeute von 75% isoliert werden.


 Abbildung 117: Bishydroxylierung der Verbindung **130**.

Im nächsten Reaktionsschritt sollte unter Einsatz von Natriumborhydrid die Öffnung des Lactams **138** bei gleichzeitiger Reduktion zum Alkohol **139** erfolgen. Dies konnte mit einer Ausbeute von 71% realisiert werden.


 Abbildung 118: Öffnung des Lactams **138** durch Natriumborhydrid.

Die Boc-Schutzgruppe wurde mittels 1%iger methanolischer HCl-Lösung abgespalten, sodass das freie Amin **140** erhalten werden konnte. Es schloss sich die Entfernung des Lösungsmittels sowie der entstandenen Bestandteile aus der Boc-Entschützung (CO₂ und Isopren) unter vermindertem Druck an. Aufgrund eines quantitativen Umsatzes wurde an dieser Stelle auf eine säulenchromatographische Reinigung verzichtet.


 Abbildung 119: Boc-Entschützung der Verbindung **139**.

Um die angestrebte Fluorsubstitution an der C-2-Position vornehmen zu können, wurde an der Aminofunktion des Triols **140** eine Dinitrophenyl-Schutzgruppe nach einer literaturbekannten Synthesevorschrift eingeführt.^[148] Dafür wurde die Verbindung **140** in DMF gelöst und mit Natriumcarbonat versetzt. Nach langsamer Zugabe des Reagenzes 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol (DNP-F; Sanger-Reagenz) wurde die Reaktion nach zwei Stunden beendet. Mittels säulenchromatographischer Reinigung konnte der Alkohol **141** in einer Ausbeute von 70% erhalten werden.

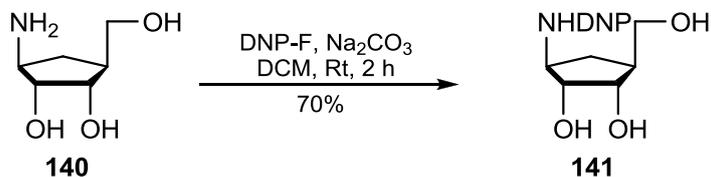


Abbildung 120: Einführung der Dinitrophenyl-Schutzgruppe.

Im Folgenden wurden die 3',5'-Hydroxylfunktionen mit dem *Markievicz*-Reagenz (TIPDS-Cl₂) geschützt, um anschließend eine selektive Substitution an der 2'-Position vornehmen zu können. Dabei wurde das in Kapitel 6.3 beschriebene Protokoll angewendet.

Nach mehrfacher säulenchromatographischer Reinigung des Rohproduktes konnte das silylierte Produkt **96** schließlich in einer moderaten Ausbeute von 39% isoliert werden.

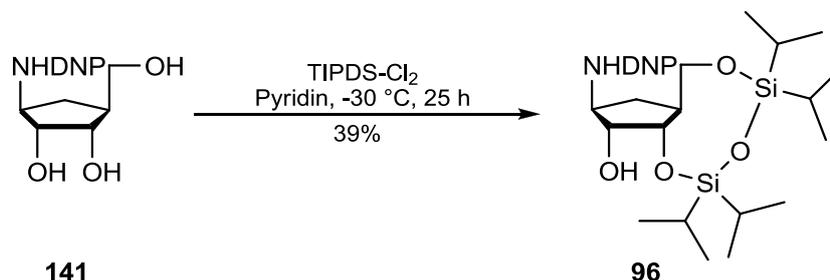


Abbildung 121: Blockierung der 3'- und 5'- Hydroxylfunktion der Verbindung **141**.

Das Vorläufermolekül **96** sollte nachfolgend mit dem Fluorierungsmittel DAST **120** zum Produkt **142** umgesetzt werden. Da bei SÖNKE JESSEL kein definitiver Beweis zur Bildung des fluorierten Vorläufermoleküls **128** vorlag und es darüber hinaus zu Schwierigkeiten bei der Aufarbeitung kam, wurden die Reaktionsparameter wie folgt geändert:

- Zugabe einer verdünnten DAST-Lösung **120** (63 mM) bei -78 °C (vorher Zugabe einer konzentrierter DAST-Lösung **120** bei -30 °C)
- Aufarbeitung durch Zugabe von einem Eis/Wasser-Gemisch (vorher Aufarbeitung durch Zugabe einer Natriumcarbonat-Lösung)

Durch diese veränderten Bedingungen sollten mögliche Nebenreaktionen, wie z.B. ausgelöst durch Abwesenheit eines basischen Milieus einer Natriumhydrogencarbonat-Lösung, vermindert werden. Darüber hinaus sollten durch die Vermeidung eines basischen Milieus die Eliminierungsreaktionen unterbunden werden.

Dementsprechend wurde nun die Fluorierungsreaktion nach BIGGADIKE, ergänzt mit den veränderten Bedingungen, durchgeführt: dazu wurde die silylierte Verbindung **96** in Dichlormethan gelöst und auf -78 °C gekühlt. Nach langsamer Zugabe der verdünnten DAST-Lösung wurde die Reaktionslösung innerhalb von 15 Minuten auf -35 °C erwärmt. Durch dünnschichtchromatographische Reaktionsverfolgung konnte ein vollständiger Umsatz beobachtet werden. Zum Beenden der Reaktion wurde das Reaktionsgemisch nochmals auf -78 °C gekühlt und mit einem Eis/Wasser-Gemisch versetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das fluorierte Molekül **142** in einer guten Ausbeute von 62% isoliert werden, womit die angepassten Reaktionsbedingungen einen guten Zugang zu der gewünschten fluorierten Verbindung **142** ermöglichten.

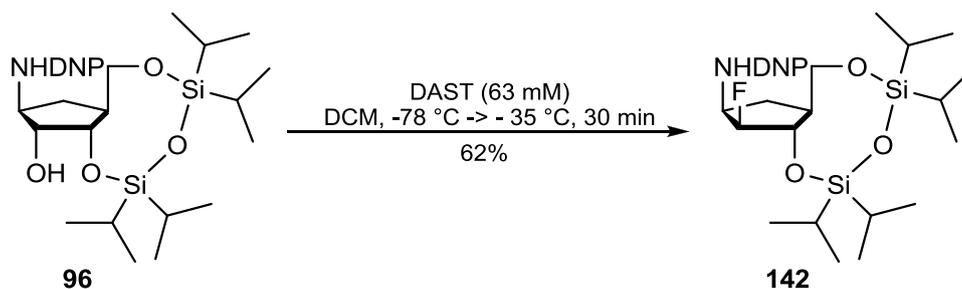


Abbildung 122: Fluorierung der silylierten Verbindung **96** mit DAST **120**.

Die NMR-Analysen bestätigen die erfolgreiche Synthese der Verbindung **142**. Wie aus dem gekoppelten ^{19}F -NMR-Spektrum ersichtlich (Abbildung 123), zeigt sich bei -195 ppm ein Multiplett, was darauf hindeutet, dass im Molekül **96** eine Fluorsubstitution stattgefunden hat. Die Fluoreinführung an der gewünschten C-2-Position wurde durch die Auswertung des ^1H -NMR-Spektrums bestätigt. Das *H*-2-Proton weist eine charakteristische H-F-Kopplungskonstante von 53.9 Hz auf, welche nur bei direkter Nachbarschaft entsteht.

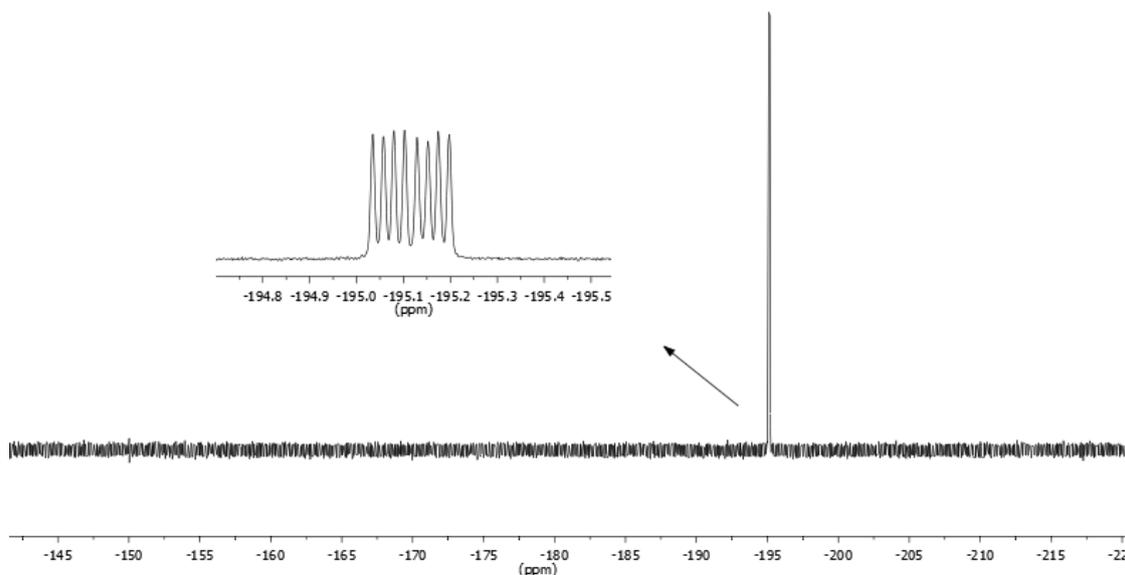


Abbildung 123: ^{19}F -NMR-Spektrum des Produktes **142**.

6.3.4 Retrosyntheseschema zur Darstellung von *carba*-L-FMAU **27** über den Baustein **92**

Nachdem ideale Reaktionsbedingungen für die Fluorierung des Vorläufermoleküls **96** entwickelt werden konnten, sollte eine Übertragung auf die Verbindung **127** erfolgen, um die Darstellung des carbocyclischen 2'-modifizierten-L-Nucleosids **27** nach einer konvergenten Synthesestrategie zu ermöglichen. Unter Verwendung von stereoselektiven Reaktionen und einer geeigneten Schutzgruppenstrategie, sollte zunächst die Schlüsselverbindung **92** in einer mehrstufigen Syntheseroute dargestellt werden. Es galt dabei, die Darstellung der silylierten Verbindung **96**, ausgehend von den optisch reinen Vorläufermolekülen **23**, **129** und **29**, auf drei verschiedenen Syntheserouten zu realisieren. Auf diese Weise sollte der effektivste Zugang ermittelt werden.

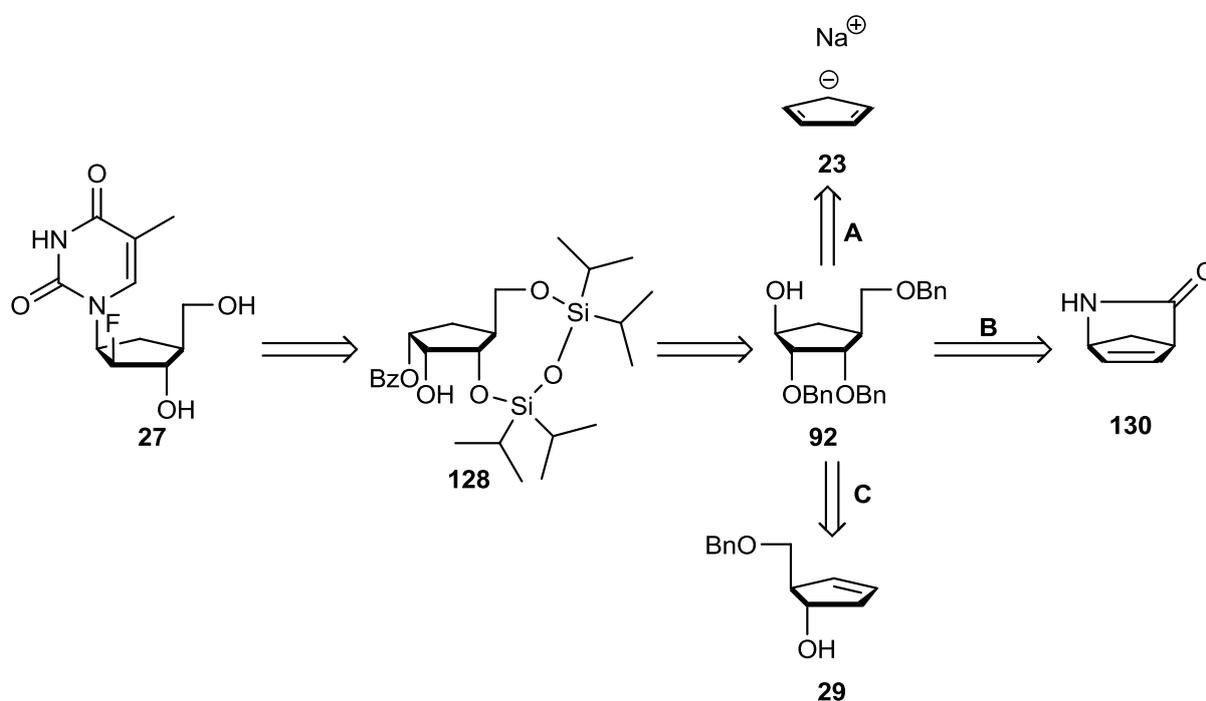


Abbildung 124: Retrosyntheseschema für die Darstellung von *carba*-L-FMAU **27** ausgehend von drei unterschiedlichen Edukten (**23**, **129** und **29**).

6.3.3.1 Syntheseroute A zur Darstellung von (1*S*,2*R*,3*S*,4*S*)-2,3-Benzylloxymethyl-4-(benzylloxymethyl)cyclopentanol **92**

In einem ersten Ansatz sollte die Verbindung **23** verwendet werden, um die Fluoreinführung über einen Vorläufer des Zielmoleküls **128** zu vollziehen. Ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Natriumcyclopentadienid **23** sollte über eine stereoselektive Hydroborierung nach BIGGADIKE das Cyclopentanol L-**29** generiert werden.^[94-97] Der Schlüsselbaustein **92** sollte im Anschluss durch erneute Hydroborierung, Eliminierung, Mitsunobu-Inversion sowie Bishydroxylierung mit anschließender Blockierung der Hydroxylfunktionen in einer mehrstufigen Sequenz dargestellt werden. Das entsprechende Retrosyntheschema ist in folgender Abbildung 125 gezeigt.

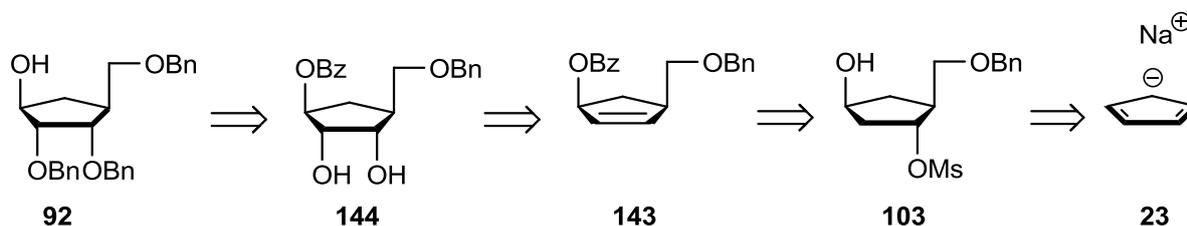


Abbildung 125: Retrosyntheschema zur Darstellung des zentralen Bausteins **92** ausgehend von Natriumcyclopentadienid **23** nach Route **A** der Abbildung 124.

Analog zu der in Kapitel 6.3.1 beschriebenen Syntheseroute, wurde die Vorläuferverbindung **103** folgendermaßen dargestellt: Zunächst wurde die Verbindung **103** nach einer Alkylierungsreaktion der Ausgangsverbindung **23**, einer Mesylierungsreaktion sowie einer Bishydroxylierungs- und einer Eliminierungsreaktion in einer Gesamtausbeute von 7% über vier Stufen erhalten (Abbildung 126).

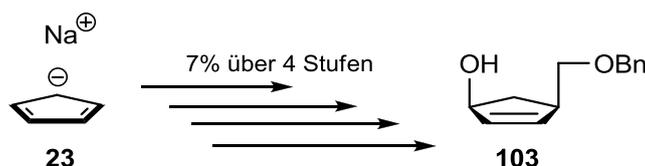


Abbildung 126: Gesamtausbeute des Cyclopentenols **103** ausgehend von Natriumcyclopentadienid **23**.

Im Folgenden sollte die freie Hydroxylfunktion der Verbindung **103** mittels einer Benzoylschutzgruppe blockiert werden (Abbildung 127). Dafür wurde der in Pyridin/Acetonitril (1:1) gelöste Alkohol **103** bei 0 °C mit Benzoylchlorid versetzt. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung konnte das Benzoat **143** in einer sehr guten Ausbeute von 86% isoliert werden.

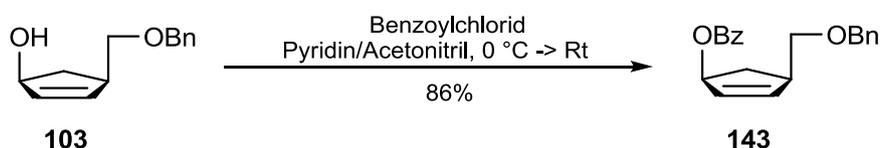


Abbildung 127: Blockierung der freien Hydroxylfunktion des Cyclopentenols **103**.

Die Einführung der beiden Hydroxylgruppen sollte erneut durch die asymmetrische Bishydroxylierungsmethode nach SHARPLESS erfolgen (vgl. Kapitel 6.3.1).^[144,145,146] Aus den Ergebnissen von MIRIAM MAHLER ist ersichtlich, dass unter Verwendung von AD-Mix α bzw. AD-Mix β jeweils das gewünschte D-Isomer **144** im Überschuss generiert werden kann.^[98] Jedoch waren Abweichungen beim Isomerenverhältnis und der Ausbeute festzustellen. Unter Einsatz von AD-Mix β konnte mit 9:1 (D-**144**:D-**145**) das beste Verhältnis und gleichzeitig eine sehr gute Ausbeute von 78% erzielt werden.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von MIRIAM MAHLER sollte in der vorliegenden Arbeit jedoch das L-Isomer **144** umgesetzt werden, weshalb bei dieser enantioselektiven Reaktion zunächst beide AD-Mix-Reagenzien bezüglich ihrer Selektivität getestet wurden. Die Umsetzung des Benzoats **143** zum Diol **144** mit AD-Mix α bzw. β erfolgte bei 0 °C in einem Lösungsmittelgemisch aus *tert*-Butanol und Wasser (2:1), zu dem Methansulfonamid hinzugegeben wurde. Nach einem Tag wurde die Reaktion durch Zugabe einer Natriumhydrogensulfidlösung beendet. Die dünnschichtchromatographische Analyse ergab, dass unter Einsatz des AD-Mix β kein Umsatz zum Diol **144** erfolgte. Im Gegensatz dazu, zeigte die Reaktion mit AD-Mix α eine vollständige Umsetzung des Startmaterials **143**.

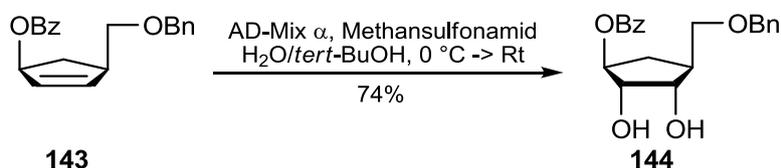


Abbildung 128: Bishydroxylierung nach SHARPLESS.^[144,145,146]

Vor der säulenchromatographischen Reinigung wurde das Verhältnis der Diastereomere **144** und **145** aus dem Rohprodukt der Reaktion mit AD-Mix α über $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestimmt. Durch die Integration der $^1\text{H-NMR}$ -Signale der diastereomeren *H*-1-Protonen konnte ein Verhältnis von 7.5:1 ermittelt werden (Abbildung 129).

Im Vergleich zu D-**144** aus MIRIAM MAHLER verhält sich das Diol **144**, die Selektivität der Bishydroxylierung betreffend, entgegengesetzt, sodass von einem *matched/mismatched*-Fall ausgegangen werden muss.

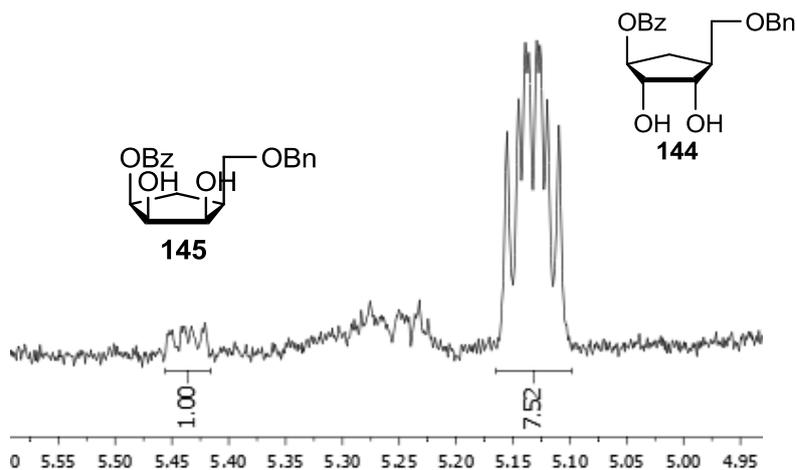


Abbildung 129: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Rohgemisches zur Bestimmung des Produktverhältnisses der Diastereomere **144** zu **145**.

Im nächsten Reaktionsschritt sollten die zuvor generierten freien Hydroxylfunktionen durch Benzylgruppen geschützt werden. Die Reaktionsbedingungen für die Blockierung der Hydroxylfunktionen wurden analog zu der Darstellung des Alkohols **30** (Kapitel 6.1.2) gewählt.

Nach Addition von Benzylbromid und TBAI zu einer Suspension aus dem Diol **144** und Natriumhydrid in THF bei 0 °C wurde die Reaktion für zwei Tage gerührt, bevor diese durch Hydrolyse des überschüssigen Benzylbromids beendet wurde. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das vollgeschützte Produkt **146** erfolgreich isoliert werden. Zusätzlich konnte eine Mischfraktion mit dem einfachbenzylierten Produkt **147** erhalten werden, welches im Anschluss in einer weiteren Benzylierungsreaktion unter den genannten Bedingungen zum Produkt **146** umgesetzt werden konnte (Abbildung 130).

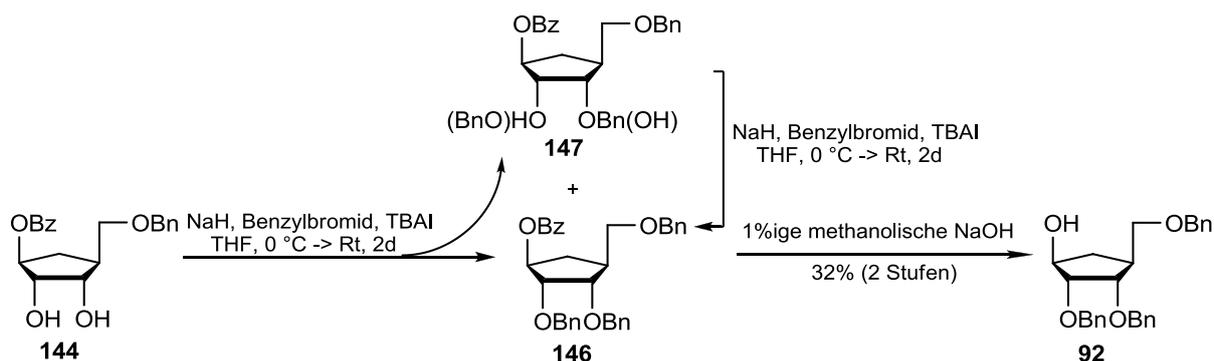


Abbildung 130: Darstellung des Vorläufermoleküls **92** aus dem Diol **144**.

Im letzten Syntheseschritt zur Darstellung des Vorläufermoleküls **92** wurde die Benzoylschutzgruppe der Verbindung **146** unter Verwendung einer 1%igen methanolischen Natriumhydroxidlösung abgespalten. Nach Neutralisation der Reaktionslösung und einer säulenchromatographischen Reinigung konnte der Alkohol **92**, analog zu den Ergebnissen von MIRIAM MAHLER, in einer moderaten Ausbeute von 59% isoliert werden.^[98]

Somit konnte der zentrale Baustein **92** ausgehend von Natriumcyclopentadienid **23** über **Route A** in acht Syntheseschritten dargestellt werden. Jedoch war die Gesamtausbeute mit 1.7%, aufgrund eines geringen Umsatzes bzw. der Bildung von Nebenprodukten in Verbindung mit einer schlechten Reproduzierbarkeiten der einzelnen Synthesen und der aufwendigen mehrmaligen Reinigungsschritte, schlecht. Daher sollte diese Synthesesequenz **A** nur verwendet werden, falls keine geeigneteren Optionen zur Verfügung stehen.

6.3.3.2 Syntheseroute B zur Darstellung von (1*S*,2*R*,3*S*,4*S*)-2,3-Benzoyloxymethyl-4-(benzyloxymethyl)cyclopentanol **92**

In einer alternativen Synthesestrategie sollte, in Anlehnung an die lineare Synthesestrategie von BIGGADIKE, die Darstellung des Cyclopentans **92** ausgehend von dem enantiomerenreinen (+)-Vince-Lactam **129** über eine orthogonalen Schutzgruppenstrategie erfolgen.^[94-97] Das entsprechende Retrosyntheseschema ist in Abbildung 131 gezeigt.

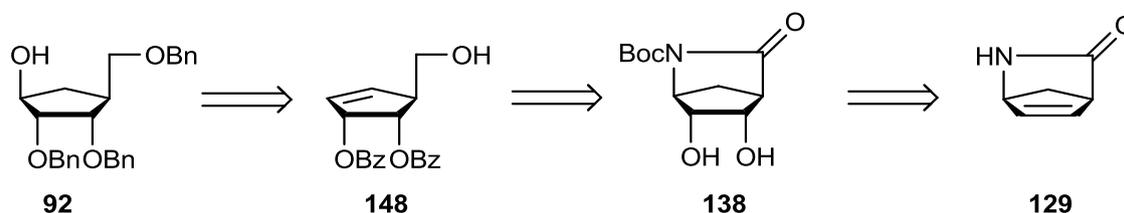


Abbildung 131: Retrosyntheseschema zur Darstellung des zentralen Bausteins **92** ausgehend vom Vince-Lactam **129** nach Syntheseroute **B** der Abbildung 124.

Für die Synthese des Schlüsselbausteins **92** musste zunächst das Boc-geschützte (+)-Vince-Lactam **130** generiert werden. Die Reaktion erfolgte in Anlehnung an SINGH.^[150] Dabei wurde das (+)-Vince-Lactam **129** durch Zugabe von Di-*tert*-butylcarbonat in einer Ausbeute von 94% zum Lactam **130** umgesetzt. Für die anschließende Einführung der *cis*-ständigen Hydroxylgruppen an die Doppelbindung vom (+)-Lactam **130** wurde wiederum das Protokoll von UPJOHN zur asymmetrischen Bishydroxylierung verwendet.^[151] Unter diesen Reaktionsbedingungen konnte das thermodynamisch stabilere *exo*-Produkt **138** nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 75% isoliert werden.

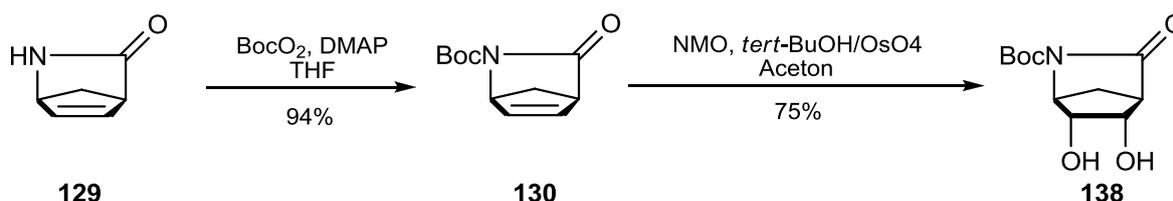


Abbildung 132: Boc-Schützung mit anschließender Bishydroxylierung ausgehend vom (+)-Vince-Lactam **129**.

Im Folgenden sollte unter Reaktionsbedingungen nach SINGH die Benzoylierung des Diols **138** erfolgen.^[150] Das in Dichlormethan gelöste Diol **138** wurde dafür mit Benzoylchlorid und DMAP umgesetzt. Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt, wobei nur ein sehr langsamer Umsatz festgestellt werden konnte.

Trotz des weiterhin detektierbaren Eduktes **138** wurde die Reaktion nach 24 Stunden abgebrochen. Nach der säulenchromatographischen Reinigung konnte eine Ausbeute von moderaten 31% erzielt werden. Durch Veränderung der Reaktionsparameter sollte in einem erneuten Ansatz ein signifikant höherer Umsatz erzielt werden. Dieses Mal wurde das Diol **138**, gelöst in einem Gemisch aus Pyridin und Acetonitril anstelle von Dichlormethan, bei 0 °C mit Benzoylchlorid versetzt. Die Reaktion wurde nach 24 Stunden beendet und nach einer säulenchromatographischen Reinigung konnte das Benzoat **149** in einer sehr guten Ausbeute von 86% isoliert werden.

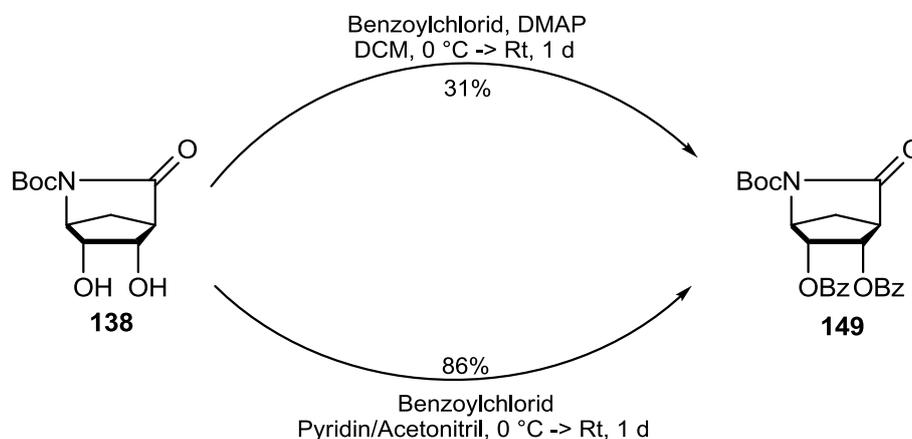


Abbildung 133: Mögliche Varianten zur Benzoylschützung der freien Hydroxylgruppen.

Im nächsten Reaktionsschritt sollte unter Einsatz von Natriumborhydrid die Öffnung des Lactams **149** bei gleichzeitiger Reduktion zum Alkohol **150** erfolgen.^[150] Dieser Reaktionsschritt konnte in einer sehr guten Ausbeute von 92% realisiert werden.

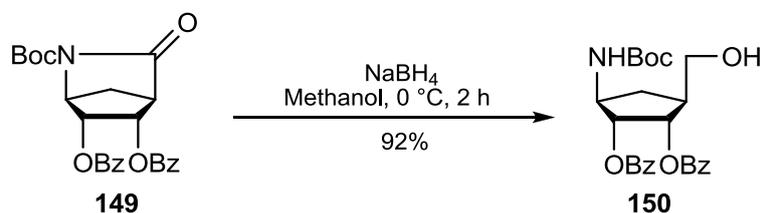


Abbildung 134: Öffnung des Lactams **149** unter Verwendung von Natriumborhydrid.

Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe mittels einer 1%igen methanolischen HCl-Lösung abgespalten, sodass das Amin **151** erhalten werden konnte.^[150] Da die Reaktionsverfolgung einen quantitativen Umsatz zeigte, wurden lediglich die flüchtigen Bestandteile (CO₂ und Isopren) im Vakuum entfernt und auf eine säulenchromatographische Reinigung verzichtet.

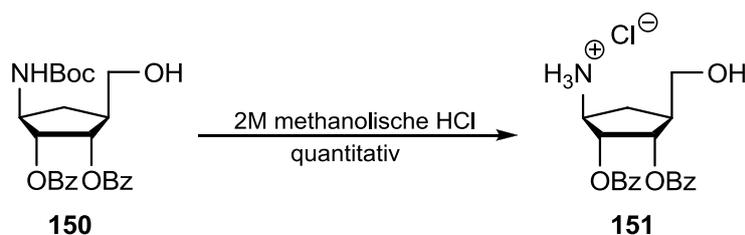


Abbildung 135: Boc-Entschützung der Verbindung **150**.

Einer der grundlegenden Reaktionsschritte dieser Syntheseroute ist die Umsetzung desamins **151** in einer Diazotierungs- und Eliminierungsreaktion zum dem entsprechenden Olefin **152**.^[150] Dafür wurde das Amin **151** mit Natriumnitrit und einem Essigsäure/Wasser-Gemisch in Acetonitril zur Reaktion gebracht.

In einem ersten Ansatz wurde lediglich eine Ausbeute von 15% erzielt, weshalb in weiteren Ansätzen der Versuch einer Ausbeutesteigerung unternommen wurde.

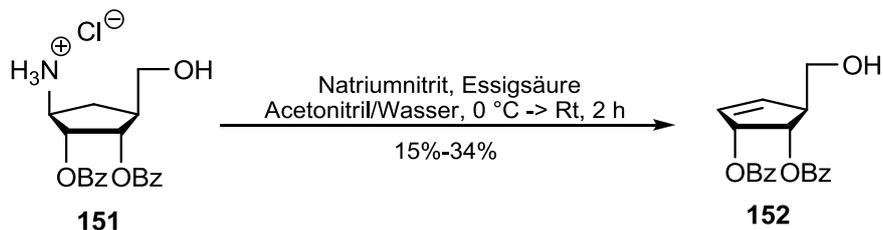


Abbildung 136: Diazotierungs- und Eliminierungsreaktion des Produktes **151**.

Der in Abbildung 137 gezeigte und allgemein ablaufende Reaktionsmechanismus bietet dabei verschiedene Ansätze zur Optimierung der Reaktionsbedingungen, weshalb der Mechanismus an dieser Stelle genauer beleuchtet werden soll. Im ersten Schritt findet ein nucleophiler Angriff desamins **153** auf das Nitrosylkation **154** statt, wodurch es zur Bildung des Kations **155** kommt.^[152] Durch Deprotonierung wird ein Nitrosamin **156** gebildet, welches zu einem Diazohydroxid **157** tautomerisiert. Das benötigte Diazoniumion **158** wird durch säurekatalysierte Dehydratisierung erhalten.^[152] Eine Eliminierungsreaktion führt schließlich zu dem gewünschten Alken **159**.

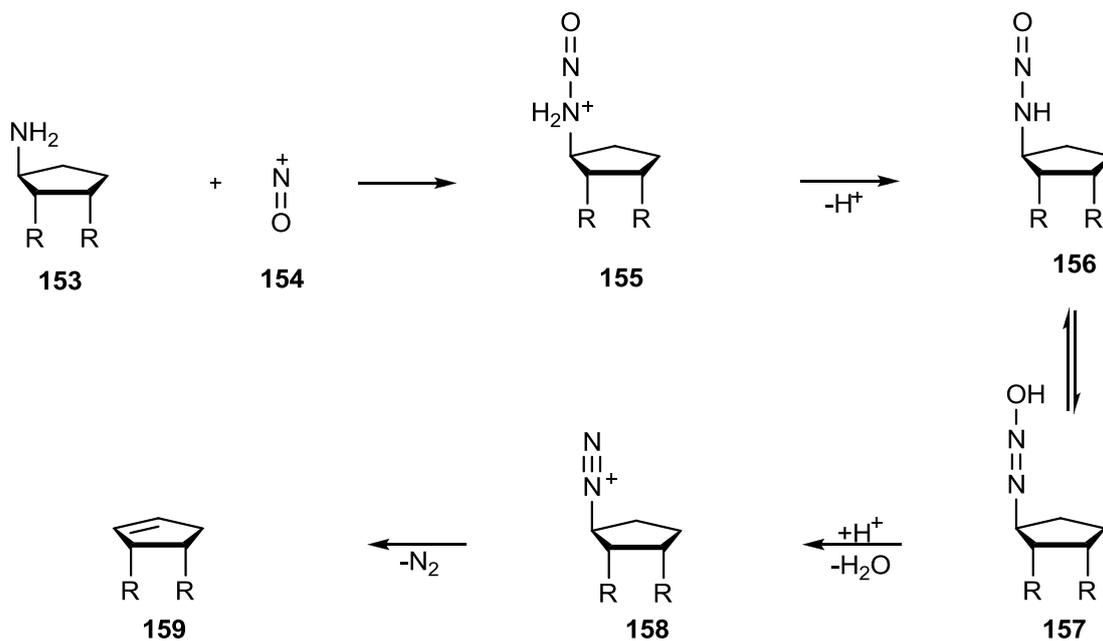


Abbildung 137: Mechanismus der Diazotierungs- und Eliminierungsreaktion.

Die erste Schwierigkeit, welche sich aus dem Reaktionsmechanismus ableiten lässt, ist die Entstehung der reaktiven Reagenzien. Daraus geht hervor, dass das Amin **153** das Nitrosylkation **154** nucleophil angreifen soll.

Allerdings liegt in der durchgeführten Reaktion die Aminogruppe der Verbindung **151** nach der Boc-Entschützung als nicht nucleophiles Salz vor. Für einen nucleophilen Angriff muss daher zunächst die Ammoniumgruppe der Verbindung **151** deprotoniert werden, um anschließend mit dem Elektronenpaar das elektrophile Nitrosylkations angreifen zu können.

Im Weiteren spielt die ausreichende Generierung des Nitrosylkations eine wichtige Rolle. Bei den gewählten Reaktionsbedingungen wird das Nitrosylkation **154** ausgehend von Natriumnitrit und Essigsäure im Lösungsmittel Acetonitril gebildet. Hierbei wird Essigsäure als Brönstedt-Säure eingesetzt und fungiert somit als Protonendonator. Bei der Gegenüberstellung der pK_s -Werte fällt auf, dass die Essigsäure im wässrigen Medium einen pK_s -Wert von 4.75 aufweist, in dem polar aprotischen Lösungsmittel Acetonitril aber einen pK_s -Wert von 23.51 besitzt. Das hat zur Folge, dass die potentielle Fähigkeit ein Proton abzugeben herabgesetzt und somit das Gleichgewicht entgegen der Bildung des Nitrosylkations beeinflusst wird.^[153,154]

Nach der Bildung der reaktiven Spezies, wird das Kation **154** schließlich nucleophil von der Verbindung **151** angegriffen. Durch Deprotonierung wird dann ein Nitrosamin **156** gebildet, das im Folgenden einer Tautomerisierung zu dem Diazohydroxid **157** unterliegt. Die Darstellung des Diazoniumions **158** kann dann unter Protonierung der Hydroxylfunktion mit anschließender Wasserabspaltung erfolgen.^[152]

Ausgehend von dem gebildeten Diazoniumion **158** ergibt sich im nächsten Schritt der Reaktionssequenz eine Konkurrenzsituation zwischen einer Eliminierungsreaktion und einer nucleophilen Substitution.^[155,156] Das angestrebte Olefin **159** entsteht hierbei durch eine Eliminierungsreaktion, wobei auch eine Substitutionsreaktion ablaufen kann.

Es kann ausgehend vom Diazoniumion **158** ein relativ stabiles Carbeniumion entstehen, wonach im Anschluss eine Substitution nach dem S_N1 -Mechanismus erfolgen kann. Nach dem HSAB-Prinzip ist dieses Kation als weiche Lewis-Säure einzustufen.^[157] Im Reaktionsgemisch vorhandene potenzielle Nucleophile sind das Chloridanion, Acetat, Wasser und Nitritanion. Die genannten Nucleophile weisen allerdings alle eine hohe Ladungsdichte auf und wirken nach dem HSAB-Prinzip als harte Lewis-Base. Die Reaktion zwischen einer weichen Lewis-Säure und einer harten Lewis-Base wird nach dem HSAB-Konzept energetisch nicht favorisiert.^[157] Folglich liegt eine nucleophile Substitution nach einem S_N1 -Mechanismus über ein Carbeniumion nicht begünstigt vor.^[157]

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei dieser Reaktion eine Vielzahl an Nebenreaktionen stattfinden kann. Als entscheidende Faktoren im Reaktionsverlauf sind dabei die Generierung des Amins aus der Verbindung **151**, die Bildung des Nitrosylkations sowie die Konkurrenzsituation zwischen einer Eliminierungsreaktion und nucleophiler Substitution ausgehend von dem Diazoniumions anzusehen. Allerdings kann bei Letzterem nur unzureichend abgeschätzt werden, inwiefern die Bildung des gewünschten Produkts energetisch favorisiert wird.

In unterschiedlichen Ansätzen wurde nun der Versuch unternommen, eine Ausbeutesteigerung der benzyolgeschützten Verbindung **152** zu erzielen. Als einen Ansatz für die Optimierung der Synthese wurde die Erhöhung der Säurekonzentration ausgemacht, da dadurch die Bildung des Nitrosylkations **154** bevorzugt werden sollte. Dabei führte zunächst der Einsatz von Salzsäure als Protonendonator zu keiner relevanten Ausbeutesteigerung. Unter Verwendung 50%iger Essigsäure wurde mit 34% die beste Ausbeute der Evaluierung erzielt. Es kann davon ausgegangen werden, dass der kritischste Faktor demnach die Generierung des Nitrosylkations ist. Trotz unterschiedlichster Ansätze zur Ausbeutesteigerung konnte die in der Literatur von SINGH publizierte Ausbeute von 54% jedoch nicht erreicht werden.^[150]

Im weiteren Verlauf der Syntheseroute wurden die Benzoylschutzgruppen des Alkens **152** mit einer 1%igen methanolischen Natriumhydroxidlösung abgespalten, sodass das Triol **160** erhalten wurde. Nach Neutralisation der Reaktionslösung und einer säulenchromatographischen Reinigung konnte das Produkt in einer Ausbeute von 84% isoliert werden.

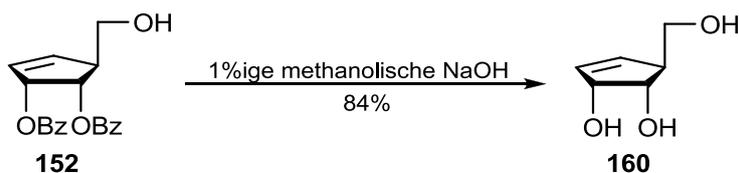
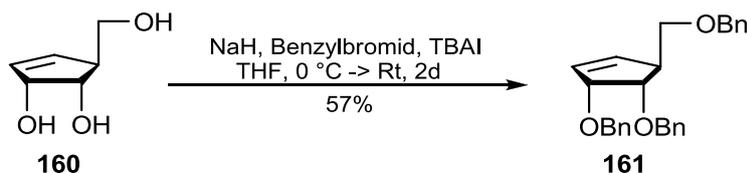


Abbildung 138: Debenzylierung von **152**.

Angelehnt an die Synthesestrategie von SÖNKE JESSEL sollte im weiteren Verlauf das vollgeschützte Alken **161** dargestellt werden.^[94] Bei der durchgeführten Reaktion wurde eine vereinfachte Schutzgruppenstrategie angewendet. Alle Hydroxylfunktionen des Triols **160** sollten mittels einer Benzylierungsreaktion blockiert werden. Dafür wurde das Triol **160** mit Natriumhydrid deprotoniert und durch Zugabe von Benzylbromid und katalytischen Mengen an TBAI alkylert. Die Reaktion wurde nach zwei Tagen durch Hydrolyse mit Eis beendet. Nach Extraktion und säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt **161** in einer moderaten Ausbeute von 57% erhalten werden.

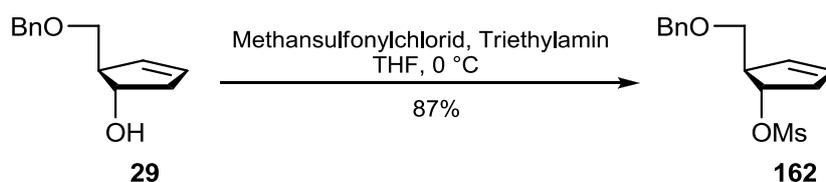

 Abbildung 139: Benzylierung der Verbindung **160**.

Da in den Syntheserouten **B** und **C** der letzte Schritt zur Darstellung des zentralen Bausteins **92** jeweils von dem identischen Molekül **161** ausgeht, wird an dieser Stelle auf das nachfolgende Kapitel verwiesen, in dem die Diskussion zur Darstellung des Cyclopentanols **92** über Route **B** und **C** erfolgt.

6.3.3.3 Syntheseroute C zur Darstellung von (1*S*,2*R*,3*S*,4*S*)-2,3-Benzyloxymethyl-4-(benzyloxymethyl)cyclopentanol **92**

In einem letzten Ansatz erfolgte die Generierung des Cyclopentanols **92** in Anlehnung an eine literaturbekannte Synthesestrategie von SÖNKE JESSEL zur Darstellung carbocyclischer 2'-modifizierter-Nucleoside.^[94]

Im ersten Schritt der Sequenz wurde die Blockierung der Hydroxylfunktion von **29** mit einer Mesylgruppe vorgenommen (s. Kapitel 6.3.1). Die eingeführte Mesylgruppe sollte auch hier im späteren Verlauf als eine, im Vergleich zur Hydroxylfunktion, gute Abgangsgruppe für eine Eliminierungsreaktion dienen. Zur Synthese der mesylierten Verbindung **162** wurde das in THF gelöste Cyclopentenol **29** bei 0 °C mit Triethylamin und Methansulfonylchlorid umgesetzt. Nach Hydrolyse von überschüssigem Methansulfonylchlorid und einer säulenchromatographischen Reinigung konnte das Mesylat **162** in einer Ausbeute von 87% isoliert werden.


 Abbildung 140: Mesylierung des Cyclopentenols **29**.

Die darauffolgende Einführung der *cis*-ständigen Hydroxylgruppen erfolgte analog zu der bereits in Kapitel 6.3.3.2 beschriebenen Reaktion nach SINGH.^[150] Bei dem Reaktionsansatz **A** der Abbildung 141 konnte jedoch auch nach einer Reaktionszeit von über 96 Stunden mittels dünnschichtchromatographischer Analyse nur ein sehr geringfügiger Umsatz festgestellt werden.

Infolgedessen wurde die asymmetrische Bishydroxylierungsmethode von SHARPLESS verwendet.^[144,145,146] Anhand der Ergebnisse von SÖNKE JESSEL wurde das Reagenz AD-Mix β für die Synthese verwendet, da es bevorzugt das benötigte Diastereomer **163** liefern sollte (Abbildung 141, Weg **B**).^[94] Die Umsetzung des Mesylats **162** zum Diol **163** mit AD-Mix β erfolgte bei 0 °C in einem Gemisch aus *tert*-Butanol und Wasser (2:1) und Methansulfonamid. Nach dem Zusammenführen aller Reagenzien wurde das Reaktionsgemisch langsam auf Raumtemperatur erwärmt und die Reaktion nach einem Tag durch Zugabe einer Natriumhydrogensulfidlösung beendet.

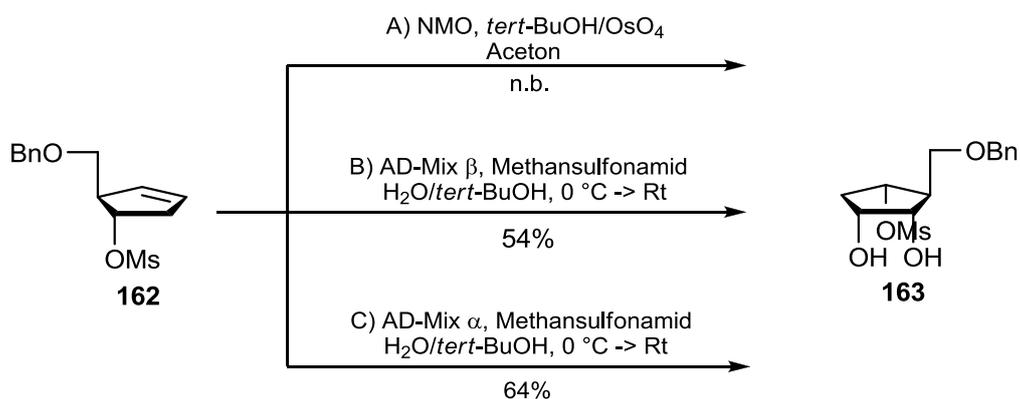


Abbildung 141: Unterschiedliche Ansätze zur Bishydroxylierung der Verbindung **162**.

Im Vorfeld der säulenchromatographischen Reinigung wurde das Verhältnis der Diastereomere **163** und **164** aus dem aufgenommenen ¹H-NMR-Spektrum bestimmt (Abbildung 142). Durch die Integration der ¹H-NMR-Signale der diastereomeren *H*-1-Protonen konnte ein Verhältnis von 4:1 bestimmt werden. Damit wurde das Diol **163** allerdings in einem schlechteren Verhältnis erhalten, als in der Literatur mit 11:1 beschrieben.^[94]

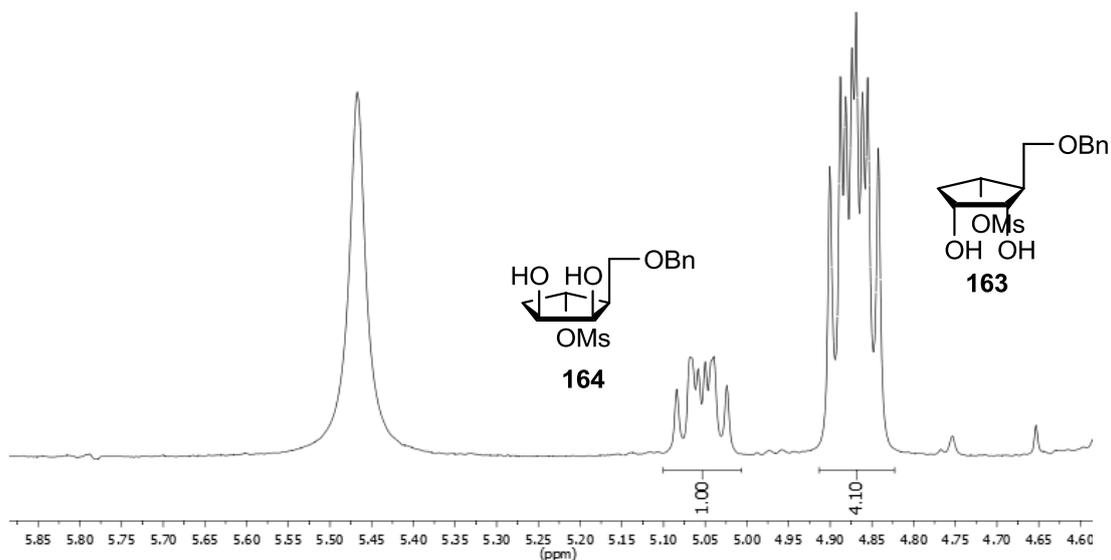


Abbildung 142: ¹H-NMR-Spektrum des Rohgemisches zur Bestimmung des Produktverhältnisses der Diastereomere **163** zu **164**.

Um ein besseres Verhältnis zwischen den Diastereomeren zu erzielen, wurde die Reaktion bei einer konstanten Temperatur von 4 °C wiederholt. Allerdings konnte durch die niedrigere Reaktionstemperatur keine positive Beeinflussung auf das Produktverhältnis beobachtet werden. Stattdessen war lediglich eine signifikante Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit festzustellen.

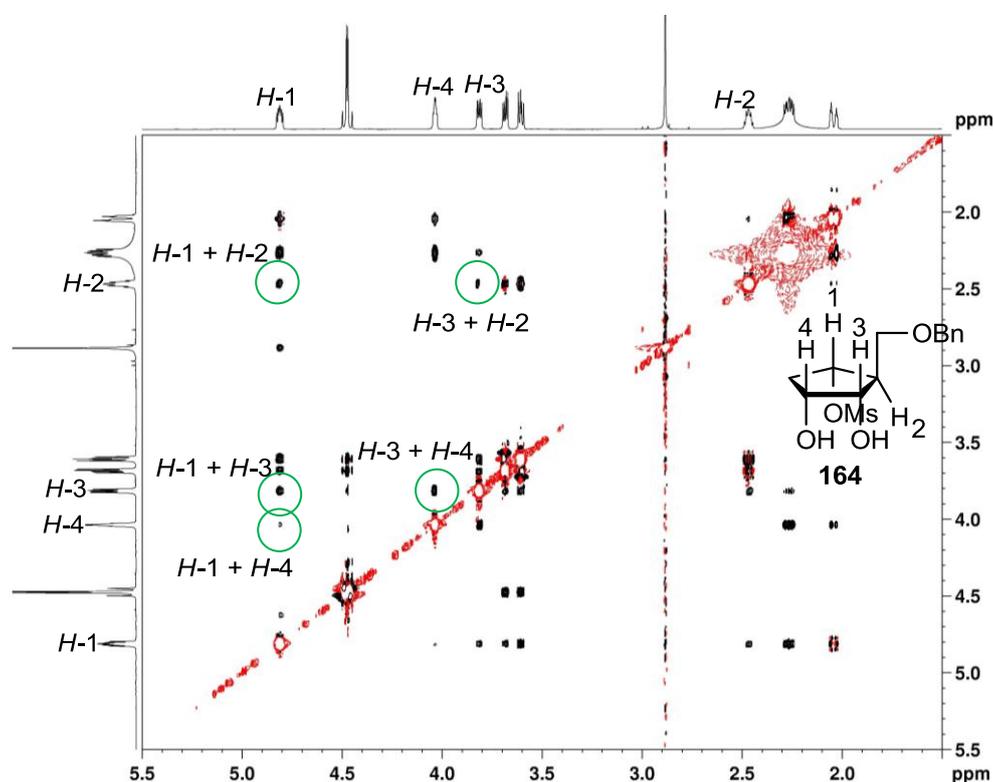
Als mögliche Alternative wurde die Umsetzung des Mesylats **162** zu dem Diastereomergemisch **163** und **164** mit dem Reagenzgemisch AD-Mix α untersucht. Das Diastereomerenverhältnis wurde wiederum aus dem Rohprodukt bestimmt. Es stellte sich heraus, dass AD-Mix α sogar zu einem besseren Verhältnis von 6:1 führte.

Zur finalen Evaluierung wurde zudem eine Umsetzung mit AD-Mix α bei einer konstanten Reaktionstemperatur von 4 °C durchgeführt. Allerdings konnte auch in diesem Fall keine positive Auswirkung auf das Produktverhältnis festgestellt werden. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse aller Ansätze aufgeführt.

Tabelle 6: Ansätze der Bishydroxylierung nach SHARPLESS unter Verwendung unterschiedlicher Reaktionsbedingungen.^[144,145,146]

Reagenz	Temperatur	Produktverhältnis 163:164	Ausbeute
AD-Mix β	0 °C -> Rt	4:1	54%
AD-Mix β	4 °C	4:1	n.b.
AD-Mix α	0 °C -> Rt	6:1	64%
AD-Mix α	4 °C	6:1	n.b.

Nach der chromatographischen Reinigung erfolgte die endgültige Charakterisierung der Konfiguration der entstandenen Diastereomere anhand der aufgenommenen NOESY-Spektren. In Abbildung 143 ist das NOESY-Spektrum des im Überschuss vorliegenden Isomers **163** gezeigt. In dem Spektrum ist jeweils eine Kopplung von *H*-1 und *H*-3 zu *H*-4 (schwach) ersichtlich, welche die Konfiguration der Positionen *H*-1, *H*-3 und *H*-4 definiert. Des Weiteren fehlt die Kopplung von *H*-2 zu *H*-4 und es ist nur eine schwache Interaktion von *H*-2 zu *H*-3 feststellbar, während jedoch eine Kopplung von *H*-1 zu *H*-2 detektierbar ist. Anhand der erhaltenen Kopplungen von *H*-1 zu *H*-2 und *H*-2 zu *H*-3 lässt sich schlussfolgern, dass das Isomer **163** so verdreht vorliegen muss, dass im NOE-Experiment auch eben jene Kopplungen zu beobachten sind. Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse, einhergehend mit den Resultaten von SÖNKE JESSEL, ist festzustellen, dass es sich bei dem Produkt um das gewünschte Isomer **163** handelt.^[94]


 Abbildung 143: NOESY-Spektrum des gewünschten Isomers **163**.

Zur Bestätigung der richtigen Auswertung wurde ergänzend das NOESY-Spektrum des nicht gewünschten Diastereoisomers **164** ausgewertet (hier nicht gezeigt). In dem NOESY-Spektrum des Isomers **164** war erwartungsgemäß eine Kopplung von *H*-2 zu *H*-3 und *H*-4 zu erkennen. Demzufolge befinden sich die *H*-2- und *H*-3-Protonen im selben Halbraum wie das *H*-4-Proton. Des Weiteren ist in dem NOESY-Spektrum keine Kopplung von *H*-1 zu *H*-2 erkennbar. Diese Ergebnisse stützen die Richtigkeit der vorgenommenen Zuordnung der Diastereomere **163** und **164**.

Resümierend konnten mit dem Reagenzgemisch AD-Mix α das Diol **163** in einer Ausbeute von 64% und in einem Verhältnis von 6:1 dargestellt werden. Die säulenchromatographische Trennung der Diastereomere **163** und **164** erwies sich als schwierig, da beide Isomere ähnliche R_f -Werte aufwiesen. Nach wiederholter Chromatographie konnte das gewünschte Isomer **163** jedoch in reiner Form isoliert werden.

Nachdem die Hydroxylgruppen erfolgreich eingefügt wurden, galt es diese im nächsten Syntheseschritt mit einer geeigneten Schutzgruppe zu versehen. Die Reaktionsbedingungen für die präferierte Benzylschützung wurden analog zu der Darstellung des benzylgeschützten Derivats **30** gewählt.

Nach Zugabe des Diols **163** zu einer auf 0 °C gekühlten Suspension aus Natriumhydrid in THF zeigte sich nach 20 Minuten eine unerwartete Braunfärbung des Reaktionsgemisches.

Es wurde dennoch entschieden den Reaktionsansatz weiter zu verfolgen und die Reagenzien Benzylbromid und TBAI hinzuzufügen. Bei der dünnschichtchromatographischen Reaktionsverfolgung zeigte sich die Bildung zahlreicher, nicht näher definierbarer Produkte. Der Abbruch der Reaktion erfolgte nach 24 Stunden durch Hydrolyse des überschüssigen Benzylbromids.

Da eine Trennung der einzelnen Verbindungen anhand der dünnschichtchromatographischen Aufspaltung nicht möglich erschien, wurden in einem erneuten Reaktionsansatz stattdessen die Reaktionsbedingungen nach MALIK zur Darstellung des gewünschten Produktes **165** angewendet.^[158] Anstelle des Lösungsmittels THF wurde DMF verwendet. Außerdem wurde die Vorgehensweise etwas verändert: Zunächst wurde das Diol **163** in DMF gelöst, auf 0 °C gekühlt und erst im Anschluss das Natriumhydrid hinzugegeben. Im weiteren Verlauf wurde auf die Zugabe von katalytischen Mengen an TBAI verzichtet und nur Benzylbromid der Reaktion hinzugefügt. Auf diese Weise konnte die Zahl der Nebenverbindungen deutlich minimiert werden, sodass nach einer säulenchromatographischen Reinigung das Produkt **165** mit einer sehr guten Ausbeute von 87% erhalten werden konnte.

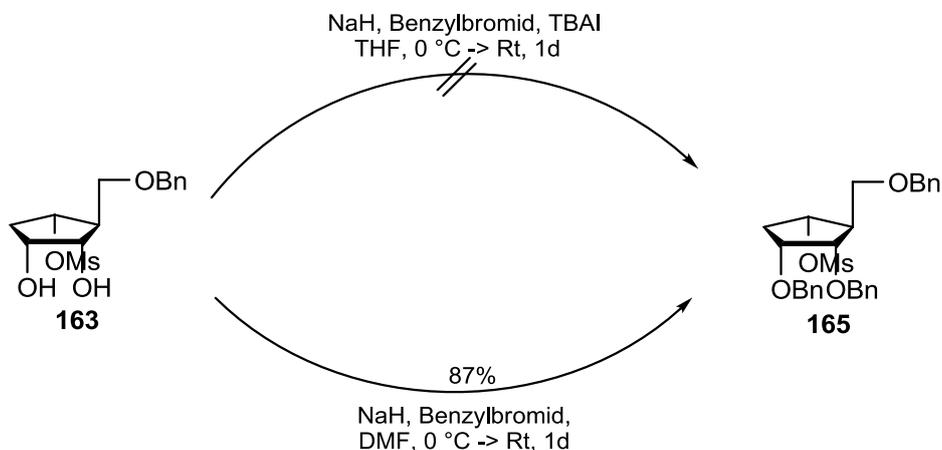


Abbildung 144: Benzylierung des Diols **163** nach unterschiedlichen Reaktionsparametern.

Im Folgenden wurde untersucht, welcher der veränderten Reaktionsparameter ausschlaggebend für die erfolgreiche Darstellung der benzylgeschützten Verbindung **165** war. Um die Notwendigkeit von DMF als Lösungsmittel zu überprüfen, wurde die Reaktion erneut in THF durchgeführt, während das übrige Protokoll des zweiten Ansatzes beibehalten wurde.

Es zeigte sich erneut die Bildung zahlreicher Nebenprodukte, woraus geschlussfolgert werden kann, dass die Änderung des Lösungsmittels den Schlüssel zur erfolgreichen Synthese der benzylgeschützten Verbindung **165** darstellte.

Anschließend sollte für die Darstellung des Schlüsselbausteins **92** die Mesylgruppe der Verbindung **165** eliminiert werden. Dafür wurden zwei unterschiedliche Reaktionsansätze, in Anlehnung an MALIK, gewählt.^[158] Nach Umsetzung des Mesylats **165** mit Kalium-*tert*-butanolat konnte das Produkt **161** in einer Ausbeute von 93% erhalten werden. Im zweiten Ansatz wurde die Reaktion in DMF unter Zugabe von Natriumhydrid und Methanol durchgeführt. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt **161** ebenfalls in einer ausgezeichneten Ausbeute von 93% isoliert werden. Aufgrund des geringen präparativen Aufwandes ist im Allgemeinen die Reaktion mit Kalium-*tert*-butylat zu bevorzugen.

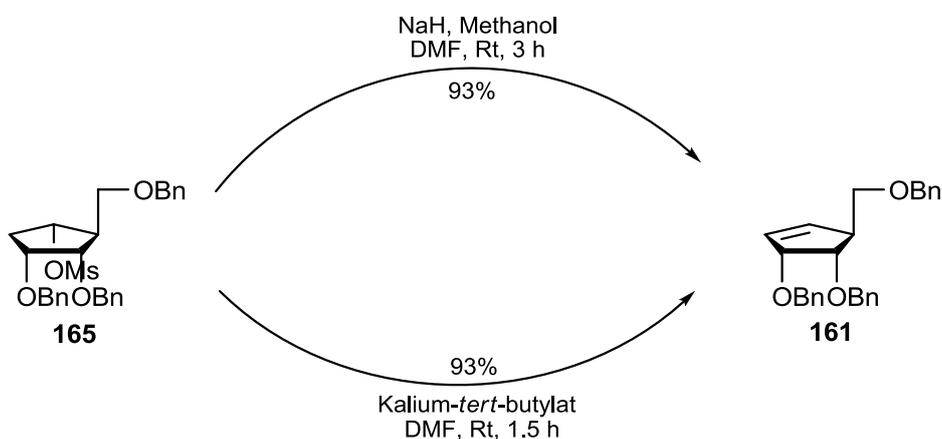
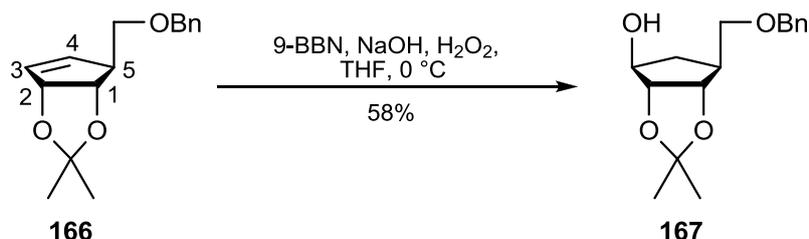


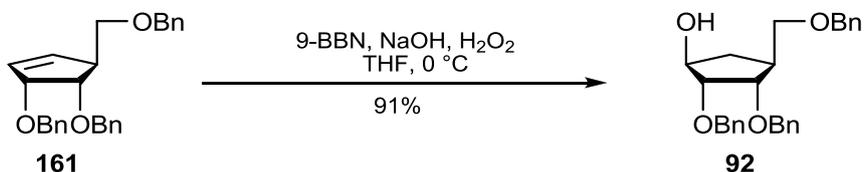
Abbildung 145: Unterschiedliche Ansätze zur Eliminierung der Mesylgruppe der Verbindung **165**.

Ein grundlegender Reaktionsschritt der vorgestellten Syntheseroute ist die stereoselektive Einführung einer Hydroxylgruppe an der C-1-Position. Ausgehend von dem Alken **161** (aus Route **B** sowie **C**) sollte die Einführung der Hydroxylgruppe über eine Hydroborierungsreaktion erfolgen. Um die Bildung möglicher Nebenprodukte, resultierend aus einer unzureichenden Regio- bzw. Stereoselektivität des verwendeten Hydroborierungsreagenzes, zu minimieren, wurde auf Vorarbeiten von SÖNKE JESSEL zurückgegriffen (Abbildung 146).^[94] Hier konnte durch den Einsatz von 9-BBN als Hydroborierungsreagenz das Cyclopentenderivat **166** zum Cyclopentanol **167** umgesetzt werden.


 Abbildung 146: Hydroborierung des Cyclopentens **166**.^[94]

Anhand der Ergebnisse von SÖNKE JESSEL wurde erwartet, dass es bei der Hydroborierung des Alkens **161** mit dem sterisch anspruchsvollen Reagenz 9-BBN zu einer Konkurrenzreaktion zwischen der C-3- und der C-4-Position kommt.^[94] Dennoch wurde für die Untersuchung der vorliegenden Arbeit vermutet, dass die Benzylgruppen, aufgrund der Sterik, die Selektivität zugunsten der C-3-Position beeinflussen.

Für die Synthese des angestrebten Cyclopentanol **92** wurde demnach das Alken **161** in THF gelöst und bei 0 °C mit dem Hydroborierungsreagenz 9-BBN umgesetzt. Die Oxidation erfolgte durch Zugabe von Natriumhydroxid und Wasserstoffperoxid. Nach Reinigung des Rohproduktes und Vergleich der erhaltenen NMR-Daten mit der entsprechenden Literatur, konnte von der gewünschten Produktumsetzung zum Cyclopentanol **92** ausgegangen werden.^[98]


 Abbildung 147: Hydroborierung des benzylgeschützten Cyclopentens **161**.

6.3.3.4 Zusammenfassung der erhaltenen Resultate aus den Syntheserouten B und C zur Darstellung des gemeinsamen Vorläufermoleküls **92**

Zusammenfassend konnte der zentrale Grundbaustein **92** in der Syntheseroute **B** der Abbildung 124 durch Verwendung des Vorläufermoleküls **129** dargestellt werden. Ausgehend von dem (+)-Vince-Lactam **129** betrug die Gesamtausbeute der Syntheseroute **B** über neun Stufen gute 8%. Diese Synthesesequenz sollte bezüglich der Diazotierungs- und Eliminierungsreaktion dennoch weiter verbessert werden, um diese Route zukünftig attraktiver für die Darstellung von carbocyclischen 2'-modifizierten-Nucleosiden zu gestalten.

Über die Syntheseroute **C** (Abbildung 124) konnte die zentrale Verbindung **92** in nur 5 Syntheseschritten mit einer Gesamtausbeute von sehr guten 41% dargestellt werden. Zudem sind die einzelnen Synthesen in größeren Grammmaßstäben reproduzierbar. Daher ist der Aufbau des Schlüsselbausteins **92** zur finalen Darstellung der carbocyclischen 2'-modifizierten-Nucleoside nach Route **C** der Abbildung 124 zu empfehlen.

6.3.5 Auf dem Weg zu carbocyclischen 2'-modifizierten-Nucleosiden

Nach der erfolgreichen Darstellung des Bausteins **92** sollte zunächst durch Invertierung der Hydroxylfunktion das Produkt **168** erhalten werden. Durch anschließende orthogonale Schutzgruppenstrategie sollte das Vorläufermolekül **127** generiert werden. Nach dem Erhalt des Produkts **127** sollten die in Vorarbeiten (Kapitel 6.3.2.1) erprobten Fluorierungsbedingungen auf die silylierte Verbindung **127** übertragen werden, sodass das gewünschte Nucleosid **27** dargestellt werden kann. Das entsprechende Retrosyntheschema ist in folgender Abbildung gezeigt.

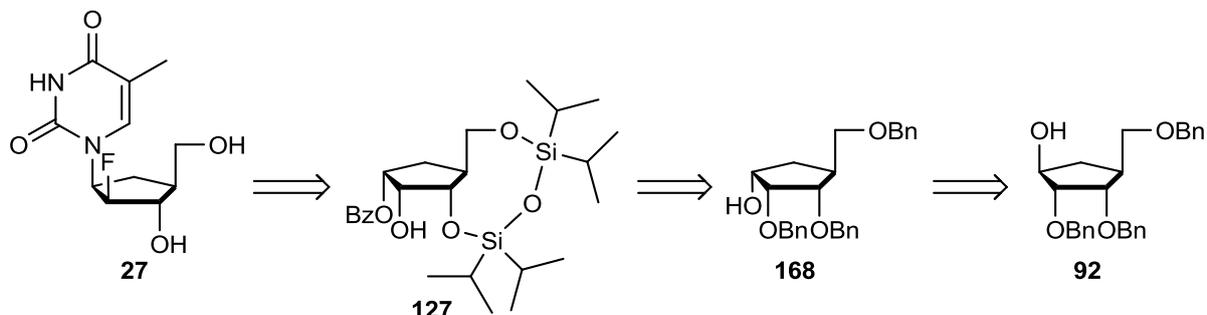


Abbildung 148: Retrosyntheschema zur Darstellung des Zielmoleküls **27** ausgehend vom Cyclopentanol **92**.

Für die spätere Kupplungsreaktion des Vorläufermoleküls **127** mit der benzoylgeschützten Nucleobase musste im Vorwege die Hydroxylgruppe an der C-1-Position des Cyclopentanol **92** invertiert werden. Bereits aus den Ergebnissen von MIRIAM MAHLER ging hervor, dass diese Reaktion nur in geringen Ausbeuten durchführbar ist.^[98] Das Cyclopentanol **92** wurde dabei unter Mitsunobu-Bedingungen mit den Reagenzien Triphenylphosphin, DIAD und Benzoesäure versetzt. Bei diesem Ansatz konnte MIRIAM MAHLER das gewünschte Produkt lediglich in einer Ausbeute von 12% darstellen.^[98]

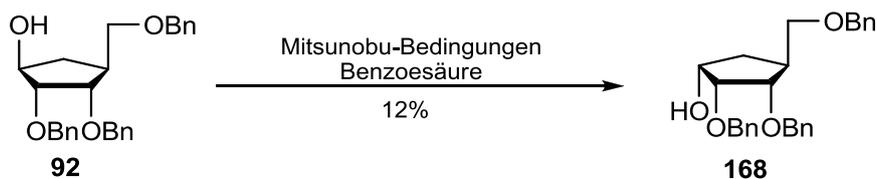


Abbildung 149: Inversion der Hydroxylgruppe nach Mitsunobu-Bedingungen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der eingesetzten Benzylschutzgruppen auf den Verlauf der Mitsunobu-Inversion untersucht werden. Im Gegensatz zu der Vorgehensweise von MIRIAM MAHLER wurde dafür auf die Verwendung der sterisch anspruchsvollen Benzoesäure verzichtet und stattdessen *Isobuttersäure* eingesetzt. Allerdings wurde in diesem Fall keine Produktbildung festgestellt. Nach Aufarbeitung des Reaktionsgemisches konnte ausschließlich das Edukt **92** reisoliert werden.

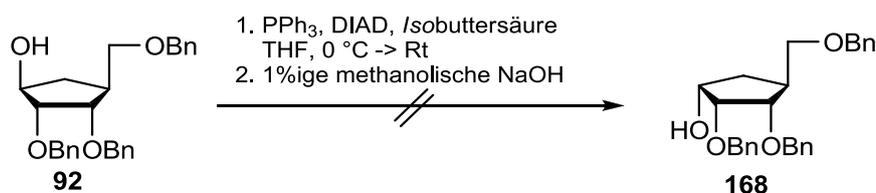


Abbildung 150: Versuch der Inversion der freien Hydroxyfunktion nach Mitsunobu-Bedingungen.

Um den möglichen Einfluss der Benzylgruppe an der C-2-Position weitergehend zu evaluieren, wurden die Reaktionsbedingungen nach einem Syntheseprotokoll von CALLAM wie folgt modifiziert.^[159] Das Cyclopentanol **92** wurde mit *para*-Nitrobenzoesäure, Triphenylphosphin **36** und DIAD **37** in Toluol umgesetzt. Wie auch bereits von LUDEK beobachtet, konnte anstelle des invertierten Alkohols **168** nach Chromatographie jedoch nur das Eliminierungsprodukt Cyclopenten **161** in einer Ausbeute von 35% isoliert werden.^[100]

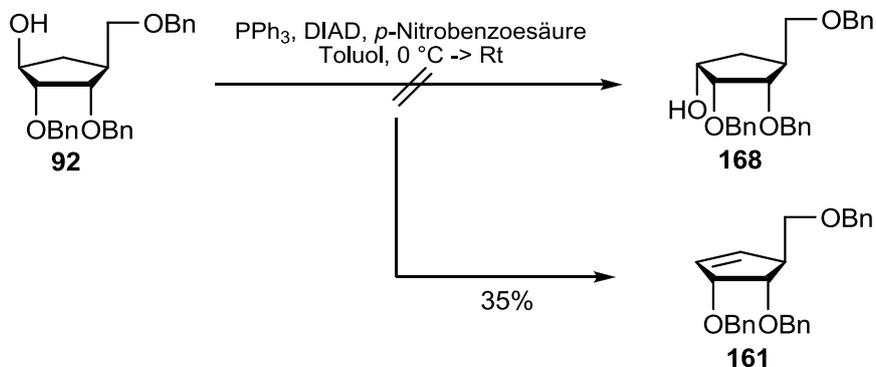


Abbildung 151: Versuch der Inversion der freien Hydroxyfunktion nach Mitsunobu-Bedingungen.

Im Gegensatz zu dem verwendeten Ausgangsprodukt **92** erlaubt das Molekül **169** nach CALLAM eine nucleophile Substitution.^[159] Hierbei wurde die Hydroxylgruppe der Verbindung **169** unter Mitsunobu-Bedingungen erfolgreich zum Alkohol **170** in einer Ausbeute von 84% invertiert (Abbildung 152).^[159] Somit scheinen u.a. sterische Einflüsse der Benzylgruppe an der C-2-Position die Inversion der Hydroxylgruppe des Cyclopentanol **92** unter Mitsunobu-Bedingungen zu blockieren.

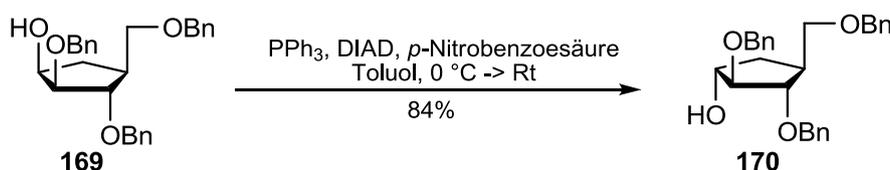


Abbildung 152: Inversion der freien Hydroxylfunktion von **169** unter Mitsunobu-Bedingungen nach CALLAM.^[159]

Angelehnt an einen Ansatz von BRÉMOND sollte stattdessen die Inversion der Hydroxylfunktion des Alkohols **92** durch Oxidation zum Keton **171** mit anschließender selektiver Reduktion zum Alkohol **168** durchgeführt werden.^[160,161,162] Dazu galt es, das Keton **171** durch Oxidation des Alkohols **92** mit dem Dess-Martin-Periodinan-Reagenz **172** darzustellen. Das in Dichlormethan gelöste Cyclopentanol **92** wurde dafür bei 0 °C zu einer Suspension des Oxidationsmittels in Dichlormethan hinzugegeben. Nach erfolgter Zugabe wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt. Die Zugabe einer Lösung aus Natriumhydrogencarbonat und Natriumthiosulfat beendete die Reaktion.

Anhand der Ergebnisse von MIRIAM MAHLER, die Untersuchungen mit einem ähnlichen Keton durchführte, war eine geringe Stabilität des Ketons anzunehmen.^[98] Dies bestätigte sich bereits beim Versuch der säulenchromatographischen Reinigung des ersten Ansatzes. Aus diesem Grund wurde lediglich eine schnelle und somit grobe säulenchromatographische Reinigung vorgenommen, sodass das Produkt nicht vollständig von Verunreinigungen separiert werden konnte und dementsprechend nur kontaminiert für die Folgereaktionen zur Verfügung stand.

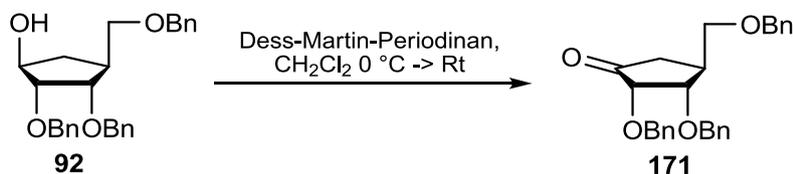


Abbildung 153: Dess-Martin-Oxidation des Cyclopentanol **92**.

Die Reaktion folgt dabei einem Additions-Eliminierungsmechanismus. Zunächst bildet sich aus dem Cyclopentanol **92** und dem Dess-Martin-Periodinan **172** unter Abspaltung von Acetat ein komplexartiges Intermediat **173**. Im zweiten Schritt wird nach einer E2-Eliminierung unter Abspaltung des Iod-Derivates **174** das gewünschte Keton **171** erhalten (Abbildung 154).^[160,161,162]

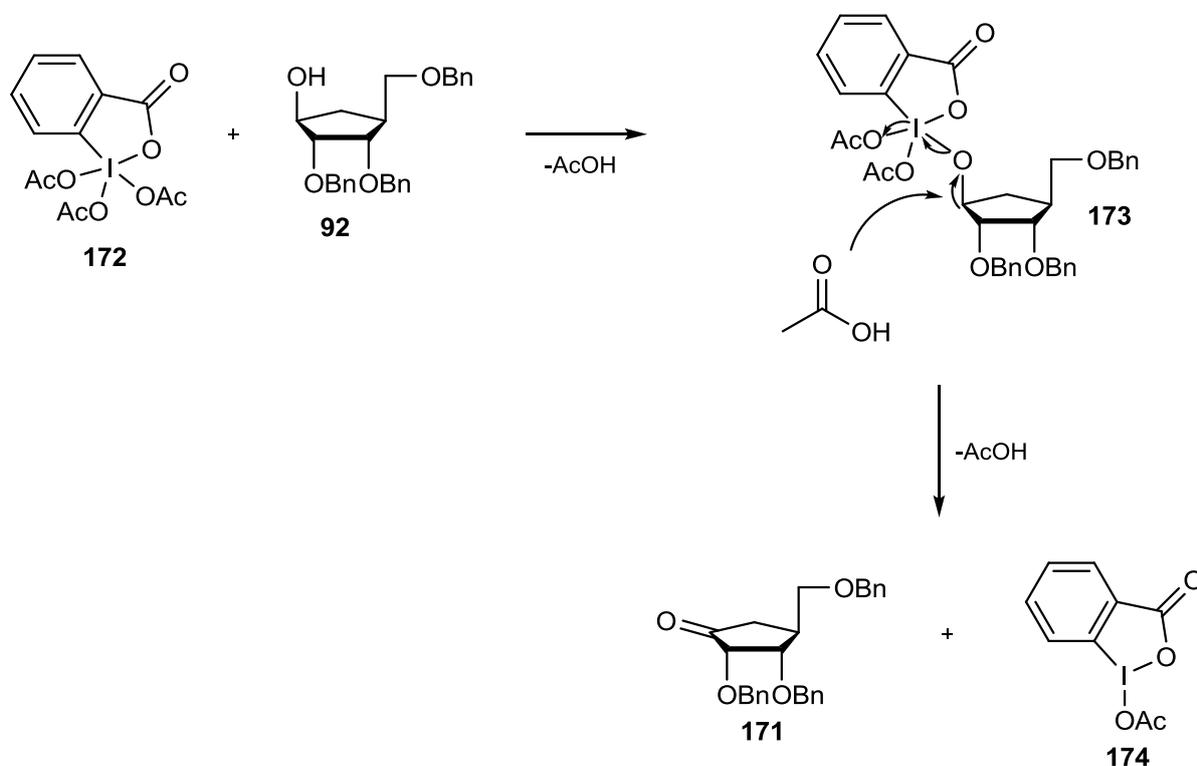


Abbildung 154: Mechanismus der ablaufenden Dess-Martin-Oxidation.^[160,161,162]

Für die anschließende Darstellung des gewünschten Alkohols **168** sollte das Cyclopentanon **171** im Rahmen der vorliegenden Arbeit selektiv reduziert werden. Selektiv daher, da sich bei dieser Reaktion theoretisch die beiden in Abbildung 155 gezeigten Alkohole **168** und **92** bilden könnten.



Abbildung 155: Mögliche Produkte der Reduktion des Ketons **171** zum Alkohol.

Allerdings ist in der Verbindung **171** der untere Halbraum durch die Benzylschutzgruppen abgeschirmt, sodass bevorzugt der gewünschte Alkohol **168** entstehen sollte. Die Reduktion des Ketons **171** sollte durch Verwendung von Lithiumaluminiumhydrid erfolgen.^[163]

Mechanistisch koordiniert dabei das Kation des Reduktionsmittels an die Carbonylfunktion des Ketons **171**, wobei es unter Hydridtransfer zur Bildung eines Salzes **175** kommt. Nach basischer oder saurer Aufarbeitung kann das Produkt **168** erhalten werden (Abbildung 156).^[164]

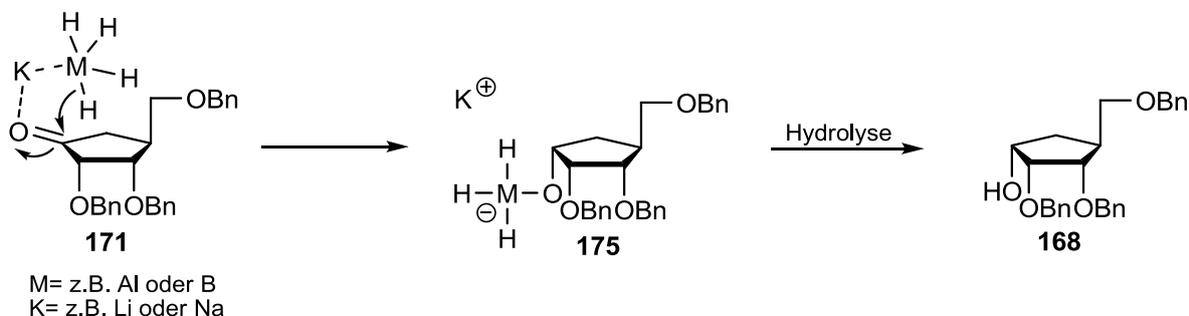


Abbildung 156: Mechanismus der selektiven Reduktion des Ketons **171** zum Alkohol **168**.^[164]

Analog zu der Synthese von BRÉMOND wurde Lithiumaluminiumhydrid in THF suspendiert.^[163] Nach Kühlung auf -78 °C wurde das gelöste Keton **171** langsam hinzugegossen und die Lösung anschließend auf Raumtemperatur erwärmt. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung wurde, neben nicht isolierten Zersetzungsprodukten, jedoch nicht das gewünschte Produkt **168** sondern die Verbindung **176** erhalten.

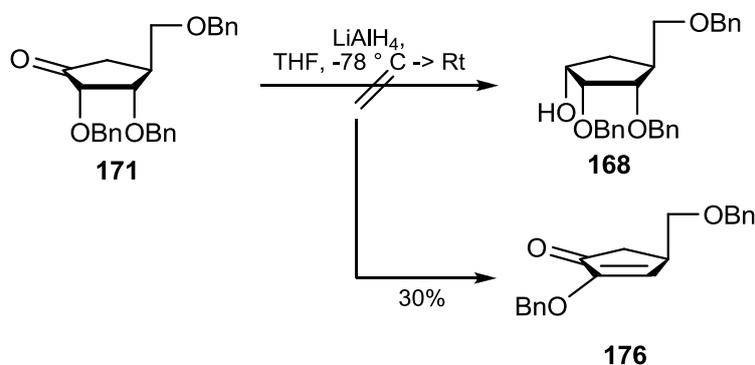
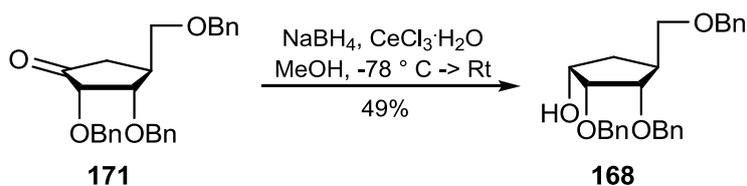


Abbildung 157: Selektive Reduktion von **171** mit Lithiumaluminiumhydrid.

In der vorliegenden Arbeit wurde als letzter alternativer Ansatz zur Darstellung des Alkohols **168** die Reaktion nach LUCHE durchgeführt.^[165] Hierfür wurde das Cyclopentanon **171** in Methanol gelöst und bei -78 °C durch langsame Zugabe von Cer(III)-trichlorid und Natriumborhydrid versetzt. Das Cersalz diente hierbei in der Reaktion als Lewis-Säure zur Aktivierung der Carbonylfunktion. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte das Produkt **168** in einer Ausbeute von 49% gewonnen werden.


 Abbildung 158: Selektive Reduktion des Ketons **171** nach LUCHE.^[165]

Da nur wenige Milligramm des Cyclopentanols **92** erhalten wurden, war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr möglich, den zuvor vorgeschlagenen Syntheseweg zu vollenden.

Zusammenfassend konnten für zukünftige Arbeiten bisher jedoch wichtige Erkenntnisse zur Darstellung von 2'-modifizierten carbocyclischen Nucleosiden gesammelt werden: Zunächst ist es möglich den Schlüsselbaustein **92** für den Zugang von 2'-modifizierten carbocyclischen Nucleosiden über jede der vorgestellten Routen (**A-C**) zu synthetisieren. Allerdings ist in zukünftigen Arbeiten die Darstellung von **92** über die Route **C** zu präferieren (siehe Kapitel 6.3.3.4). Anhand der Syntheseroute **C** ist die Verbindung **92** über fünf Syntheseschritten und mit einer Gesamtausbeute von sehr guten 41% am effizientesten zugänglich. Durch optimierte Reaktionsbedingungen konnte anschließend der invertierte Alkohol **168** durch selektive Reduktion nach LUCHE in einer guten Ausbeute von 49% dargestellt werden. Im Anschluss sollte der Alkohol zum fluorierten Produkt **27** umgesetzt werden. Dazu wurden in eigenen Vorarbeiten (siehe Kapitel 6.3.2.1) die optimalen Reaktionsbedingungen an dem Molekül **96** für die Fluorierung erprobt und etabliert. Durch Übertragung dieser Erkenntnisse sollte nun die Darstellung der Verbindung **27** über die Synthese der silylierten Verbindung **128** (siehe Retrosyntheschema in Abbildung 125) in der Zukunft erfolgreich ablaufen können.

7. Experimenteller Teil

7.1 Allgemeines

7.1.1 Lösungsmittel

Die in der nachstehend angeführten Auflistung enthaltenen Lösungsmittel wurden ohne weitere Bearbeitung eingesetzt, sofern nicht anders angeführt.

Acetonitril:	CH_3CN ; Sdp.: 82 °C; VWR 83639.320 HPLC-grade; zur präparativen Chromatographie.
Dichlormethan:	CH_2Cl_2 ; Sdp.: 40 °C; zur präparativen Chromatographie, bei Normaldruck destilliert.
Diethylether:	Et_2O ; Sdp.: 35 °C; unter vermindertem Druck destilliert und über Natriumhydroxid gelagert.
Essigsäureethylester:	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$; Sdp.: 77 °C; zur präparativen Chromatographie, bei Normaldruck destilliert.
<i>n</i> -Hexan:	C_6H_{14} ; Sdp.: 69 °C; Sigma Aldrich 34859, HPLC-grade.
Methanol:	MeOH ; Sdp.: 65 °C; zur präparativen Chromatographie und Synthese, bei Normaldruck destilliert.
Petrolether (50-70):	Sdp.: 50–70 °C; zur präparativen Chromatographie, bei Normaldruck destilliert.
<i>iso</i> -Propanol:	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$; Sdp.: 82 °C; Honeywell 10311056, HPLC-grade.
Triethylamin:	Et_3N ; Sdp.: 89 °C, zur präparativen Chromatographie, bei Normaldruck destilliert.
Toluol:	C_7H_8 ; Sdp.: 111 °C; zur präparativen Chromatographie, in technischer Qualität verwendet.

7.1.2 Absolute Lösungsmittel

Sofern nicht zusätzlich aufgeführt, wurden die unten aufgelisteten abs. Lösungsmittel ohne weitere Bearbeitung eingesetzt.

Acetonitril:	CH_3CN ; Sdp.: 82 °C; über Calciumhydrid getrocknet; für chemische Synthesen.
Chloroform- d_1 :	CDCl_3 ; Sdp.: 62 °C; Euroiso-Top D007H für NMR-Analytik.
Dimethylsulfoxid- d_6 :	$\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$; Sdp.: 190 °C; Deutero 009507 für NMR-Analytik.
Dichlormethan:	CH_2Cl_2 ; Sdp.: 39.8 °C; aus der Trocknungsanlage MB SPS-800, über Molsieb gelagert; für chemische Synthesen.
Diethylether:	Et_2O ; Sdp.: 34 °C; über Natrium getrocknet, bei Normaldruck unter Stickstoffatmosphäre destilliert; für chemische Synthesen.
<i>N,N</i> -Dimethylformamid:	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$; Sdp.: 153 °C; Acros Organics 326870010, über Molsieb gelagert; für chemische Synthesen.
Methanol:	MeOH ; Sdp.: 65 °C; Sigma Aldrich 65542, über Molsieb gelagert; für chemische Synthesen.
Pyridin:	$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$; Sdp.: 116 °C; aus der Trocknungsanlage MB SPS-800 oder über Natrium getrocknet, über Molsieb gelagert; für chemische Synthesen.
Tetrahydrofuran:	$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}$; Sdp.: 66 °C; aus der Trocknungsanlage MB SPS-800, über Molsieb gelagert oder über Kalium getrocknet; für chemische Synthesen.

7.1.3 Enzyme und molekularbiologische Reagenzien

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten enzymatischen Assays wurden unter Verwendung nachstehender Enzyme durchgeführt:

FIREPol [®] DNA-Polymerase:	Solis BioDyne, 01-01-00500
Klenow Fragment:	Thermo Scientific
Humane DNA-Polymerase β :	Novoprotein, C-159
Humane DNA-Polymerase γ :	Roboklon, E1076-01
HIV-Reverse-Transkriptase:	Roboklon, E1373-01
T4 Polynucleotidkinase:	Fermentas, EK0031
[γ - ³² P]-ATP:	Hartmann Analytic, SRP-301, 30 mCi/mL
dNTPs [100 mM]:	Thermo Scientific, R0181

7.1.4 Phosphoramidite, DNA- und RNA-Oligonucleotide

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Phosphoramidite, DNA- und RNA-Oligonucleotide benutzt:

Phosphoramidite:

<i>i</i> Pr-Pac-dG-CE Phosphoramidit	Glen Research
Pac-dA-CE Phosphoramidit	Glen Research
dA-CE Phosphoramidit	Link Technologies
dC-CE Phosphoramidit	Link Technologies
dT-CE Phosphoramidit	Link Technologies
<i>t</i> Bu-dG-CE Phosphoramidit	Link Technologies

DNA-Oligonucleotide:

3'-GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCA AAG TCA-5'	Invitrogen
3'-GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCA AAG ACA-5'	Invitrogen
3'-GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCA AAT TTT-5'	Invitrogen
3'-GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCA AAC CCC-5'	Invitrogen
3'-GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCA AAG GGG-5'	Invitrogen
3'-GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCA ATA TAT-5'	Invitrogen
3'-GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCA ACA CAC-5'	Invitrogen
3'-GCA ACC AGG ACT TCC TCC TAT CCA AGA GAG-5'	Invitrogen
5'-CGT TGG TCC TGA AGG AGG ATA GGT T-3'	Invitrogen

RNA-Oligonucleotid:

3'-gca acc agg acu ucc ucc uau cca aag uca-5'	Biomers
-----------------------------------------------	---------

7.1.5 Puffer und Lösungen

Nachfolgend sind die Zusammensetzungen sämtlicher Lösungen und Puffer aufgeführt, die in dieser Arbeit für molekularbiologische Untersuchungen oder zur HPLC-Analytik verwendet wurden.

7.1.5.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Untersuchungen

TAE-Puffer (50x):	Eisessig (1 M), Tris (2 M), Dinatriumsalz EDTA (50 mM); pH 8.5
Acrylamid-Lösung (20%):	20 mL TAE-Puffer (50x), 480 g Harnstoff, 500 mL Acrylamid/Bisacrylamid (19:1), 1 mL TEMED und ad 1 L Wasser Zu beachten: Harnstoff und Acrylamid/Bisacrylamid über Nacht bei RT rühren lassen. Erst dann TAE-Puffer, Wasser und TEMED hinzufügen.
Harnstoff-Lösung (8 M):	8 M Harnstoff in TAE-Puffer (1x)
Natriumacetat-Lösung (0.3 M):	Natriumacetat; pH 5.2
APS-Lösung (10%):	10% APS (w/v) in Reinstwasser

2x RNA-Loading Puffer: Formamid (95%, v/v), SDS (0.025%, v/v), Bromphenolblau (0.025%, w/w), Xylen Cyanol (0.025%, w/w), Ethidiumbromid (0.025%), EDTA (0.5 mM) in TAE-Puffer

Hybridisierungs-Puffer: Tris (20 mM), NaCl (50 mM); pH 7.4

Beladungspuffer: 45 mM Tris, 45 mM Borat, 100 mM EDTA, 4 M Harnstoff, 0.05% SDS, 10% Sucrose

7.1.5.2 Puffer zur Verwendung in HPLC-Analysen

TEAA-Puffer für die Reinigung/Trennung der DNA-Oligonucleotide: Triethylammoniumacetat (100 mM); pH 7.0

TBAA-Puffer für die Analytik der Nucleosidtriphosphate: Tetrabutylammoniumacetat (2 mM); pH 6.0

7.1.6 Chromatographische Analysen

7.1.6.1 Dünnschichtchromatographie

Es wurden mit Kieselgel und Fluoreszenzindikator beschichtete Aluminiumfolien der Firma Macherey-Nagel (Alugram[®] Xtra SIL G/UV₂₅₄, Schichtdicke 0.2 mm) verwendet. Alle R_F-Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. Die Detektion von UV-aktiven Substanzen erfolgte mit Hilfe einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm. Um darüber hinaus auch alle nicht UV-aktiven Verbindungen auf den benutzten Aluminiumfolien sichtbar zu machen, wurden diese mit einem Zuckerfärbereagenz derivatisiert und unter Weißlicht detektiert.

7.1.6.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Reinigung der synthetisierten Oligonucleotide und die Stabilitätstests der Intermediate wurden an einer VWR-Hitachi-HPLC-Anlage mit folgenden Spezifikationen durchgeführt:

Software: EZChrom Elite
 Pumpe: Model L-2130
 Autom. Probenwechsler: Model L-2200
 Detektor: Diode Array Detektor Model L-24551
 Säulenofen: Merck Hitachi LaChrom L-7360

Dabei wurden die folgenden Säulen verwendet:

EC 125/3 Nukleodur 100-5 C₁₈ ec für Stabilitätstests, Firma: Macherey-Nagel XTerra®
MS C₁₈ für die Oligonucleotid-Reinigung, Firma: Waters

HPLC-Methoden:

Die beschriebenen Analysen wurden mit den nachfolgenden Analysenmethoden durchgeführt.

Methode 1 (für die Reinigung der 13mer-Oligonucleotide):

Innerhalb von 0-25 Minuten wurde ein 100 mM Triethylammonium-Puffer (pH 7.0) in Wasser mit einem Gradienten von 0-15% Acetonitril bei 23 °C und einer Flussrate von 1 mL/min verwendet.

Methode 2 (für die Reinigung der 30mer-Oligonucleotide):

Innerhalb von 0-36 Minuten wurde ein 100 mM Triethylammonium-Puffer (pH 7.0) in Wasser mit einem Gradienten von 0-15% Acetonitril bei 23 °C und einer Flussrate von 1 mL/min verwendet.

Methode 3 (für die Stabilitätstests der Verbindungen aus Kapitel 6.2.2):

Innerhalb von 0-20 Minuten wurde ein 2 mM Tetrabutylammonium-Puffer (pH 6.0) in Wasser mit einem Gradienten von 5-80% Acetonitril und einer Flussrate von 1 mL/min verwendet.

7.1.6.3 Gaschromatographie (GC)

Die Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse der Cyclopentenole L- und D-**29** wurde an einer Agilent Technologies-Anlage (Model GC 7890-A) mit folgenden Spezifikationen durchgeführt:

Software:	OpenLAB CDS EZChrom
Einlass:	Kapillar S/SL Einlass mit EPC
Autom. Probenwechsler:	7693A
Detektor:	Flammenionisationsdetektor mit EPC

Dabei wurde die folgende analytische Säule verwendet:

FS HYDRODEX β-6TBDM	Firma: Macherey-Nagel
---------------------	-----------------------

GC-Methode

Methode zur Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse der Cyclopentenole L- und D-**29**:

Trärgas: Stickstoff, Flussrate: 25 mL/min, Druck: 0.86 bar, Injektor: Split 20:1, Injektionsvolumen: 1 µL, Injektortemperatur: 200 °C, Ofentemperatur: 150 °C von 0 bis 70 min, Detektortemperatur: 220 °C, Probe: gelöst in 1 mL CH₂Cl₂.

7.1.7 Spektroskopie und Spektrometrie

Nachfolgend sind alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten spektroskopischen und spektrometrischen Messungen näher beschrieben.

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden in den spektroskopischen Abteilungen des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg auf Geräten der Firma Bruker aufgenommen. Die NMR-Messungen erfolgten an den NMR-Spektrometern AVANCEIII HD 600 MHz, AVANCE 400 MHz und Fourier 300 MHz. Nach FULMER wurde entsprechend auf das jeweilige Lösungsmittelsignal kalibriert. Die chemische Verschiebung der ³¹P-NMR-Signale wurde gegen 85%ige Phosphorsäure als externen Standard angegeben. Die chemische Verschiebung der ¹⁹F-NMR-Signale wurde gegen CCl₃ als externen Standard angegeben.

UV/Vis-Spektroskopie (UV/Vis)

Die Konzentrationsbestimmung der Oligonucleotid-Lösungen erfolgte an dem Gerät Nanodrop 2000c der Firma Thermo Scientific.

Infrarotspektroskopie (IR)

Die IR-Spektren wurden an dem FT-IR-Spektrometer Model Alpha P mit Platinum-ATR-Modul der Firma Bruker aufgenommen.

Massenspektrometrie (MS)

Alle Massenspektren wurden im Institut für Organische Chemie an der Universität Hamburg aufgenommen.

Die ESI-Massenspektren wurden an einem Agilent 6224 ESI-TOF-Massenspektrometer im positiven oder negativen Modus oder an einem Bruker Daltonik maXis™ ESI-Q-TOF Spektrometer im negativen Modus aufgenommen.

Die MALDI-Messungen wurden an einem Bruker Daltonik ultrafleXtreme™ Spektrometer durchgeführt. Als Matrix diente eine gesättigte Lösung aus 3-Hydroxypicolinsäure in einem Gemisch aus Wasser/Acetonitril (1:1 v/v) mit 10 mg/mL Ammoniumdihydrogencitrat.

7.1.8 Weitere Geräte

Im Folgenden sind alle Geräte genannt, die zusätzlich zu den bereits beschriebenen Geräten in dieser Arbeit genutzt wurden.

DNA-Synthesizer

Die Synthese der Oligonucleotide erfolgte an einem DNA-Synthesizer H-8 der Firma K&A Laborgeräte.

Gefriertrocknung

Mit Hilfe der Gefriertrocknungsanlage Christ Alpha 2-4 LD_{Plus} wurden Substanzen aus wässrigen Lösungen gewonnen.

Reinstwasseranlage

Milli-Q Wasser (Reinstwasser) wurde mittels der Anlage arium® pro UV-Reinstwassersystem der Firma Sartorius erzeugt.

pH-Messgerät

Die Einstellung der pH-Werte von entsprechenden Pufferlösungen erfolgte mit Hilfe des pH-Meters ProLab 3000 der Firma Schott.

Thermocycler

Zur radioaktiven Markierung des Primers wurde der Mastercycler® personal der Firma Eppendorf AG verwendet.

Für biochemische Untersuchungen wurde der Thermocycler 5436 der Firma Eppendorf eingesetzt.

Polarimeter

Zur Bestimmung des Drehwertes optisch aktiver Substanzen diente ein P8000 Polarimeter der Firma A. Krüss Optonic GmbH. Die Drehwerte der Verbindungen wurden bei einer Wellenlänge von 589 nm (Natrium-Lampe) bestimmt.

7.2 Molekularbiologische Methoden

7.2.1 Gelelektrophoretische Trennung und Reinigung der radioaktiv markierten Primer

Nachfolgend sind die Protokolle der durchgeführten gelelektrophoretischen Trennungen sowie die präparative Reinigung der radioaktiv markierten Substanzen beschrieben.

Präparative, denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Reinigung der markierten Primer erfolgte anhand einer präparativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Verwendung des vertikalen Gelelektrophoresesystems Mini Protean® Tetra Cell von der Firma Bio-Rad wurde dabei bevorzugt, sowie das dazugehörige Zubehör zur Gelpräparation mit einer Gelgröße von 130 °mm x 80 °mm x 0.75 °mm.

Die Zusammensetzung der 10%igen denaturierenden Polyacrylamid-Gele (PAA-Gel) ist in Tabelle 7 gezeigt.

Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten 10%igen denaturierenden PAA-Gele.

Komponente	Volumen [mL]
Acrylamid-Lösung (20%)	4
Harnstoff-Lösung (8M)	4
APS-Lösung (10%)	0.056

Analytische, denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse der durchgeführten Polymerase-Assays wurde ein 15%iges Sequenziergel der Gelgröße 370 mm x 180 mm x 0.5 mm verwendet. Die Glasplatten wurden vor Benutzung mit einer 5%igen Dichlordimethylsilan-Lösung in Chloroform silyliert, um eine ideale Präparation der Gele zu gewährleisten.

Tabelle 8: Zusammensetzung der verwendeten 15%igen denaturierenden PAA-Gele.

Komponente	Volumen [mL]
Acrylamid-Lösung (20%)	22.5
Harnstoff-Lösung (8M)	7.5
APS-Lösung (10%)	0.21

Autoradiographische Detektion der Nucleinsäuren

Die Exponierung der radioaktiven PAA-Gele erfolgte in einer Exposure Cassette der Firma Bio-Rad. Auf dem zuvor belichteten Storage Phosphor Screen der Firma GE Healthcare konnte die β -Strahlung der zerfallenen Phosphor-Isotope detektiert werden. Die Expositionszeit richtete sich dabei nach der Radioaktivität der zu untersuchenden Probe. Die Visualisierung erfolgte durch den Molecular Imager FX der Firma Bio-Rad. Zur Auswertung der erhaltenen Ergebnisse wurde die Software Quantity One[®] herangezogen.

7.2.2 Primer-Verlängerungs-Studien

Nachfolgend werden die einzelnen Schritte der *primer extension assays* detailliert beschrieben.

Radioaktive Markierung

Die radioaktive Markierung des Primers erfolgte unter Verwendung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ als radioaktives Substrat. Der Reaktionsansatz wurde so gewählt, dass dessen Endkonzentration 40 pmol betrug. Entsprechend der Halbwertszeit von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ -Aktivität musste die Mengenzugabe korrigiert werden (Tabelle 9).

Tabelle 9: Reaktionsansatz für eine radioaktive Markierung.

Komponente	Volumen [μL]
Primer (10 μM)	4
10xPNK-Puffer	4
PNK-Enzym	1
[γ - ^{32}P]-ATP	1-4
Reinstwasser	26-30

Die radioaktive Markierung erfolgte im voreingestellten Inkubationsprogramm des Thermocyclers (Tab. 9). Die Reaktion wurde durch Erhitzung auf 80 °C beendet.

Tabelle 10: Reaktionsparameter des Inkubationsprogramms der Primermarkierung.

Inkubationsprogramm	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Reaktion	37	30
Inaktivierung	80	10

Zur Reinigung des markierten Primers wurde im Anschluss eine präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung eines 10%igen PAA-Gels bei 13 W und 22 Minuten durchgeführt. Nach der Detektion wurde der entsprechende Bereich des markierten Primers durch Diffusionselution aus dem Gel extrahiert. Die mit dem Skalpell zerkleinerten Gelstücke wurden dafür je zweimal 45 min bei 50 °C in 500 μL einer Natriumacetat-Lösung (pH 5.2) inkubiert. Die anschließende Alkoholpräzipitation wurde durch Zugabe von 1 mL kaltem *iso*-Propanol und 2 μL Glykogen erzielt. Nach Fällung über Nacht bei -20 °C wurde diese Lösung bei 4 °C mindestens 30 Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 100 μL einer 70%iger Ethanol-Lösung gewaschen, wiederum 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das gewaschene Pellet wurde bei 37 °C getrocknet und zuletzt in 10 μL Reinstwasser aufgenommen.

Hybridisierung

Bei der durchgeführten Hybridisierung lagert sich an das komplementäre Templat (30 nt) der radioaktiv markierte Primer (25nt) am 3'-Ende an.

Der Hybridisierungsansatz (Tabelle 11) wurde im Thermocycler für 5 min bei 95 °C denaturiert und im ausgeschalteten Modus innerhalb von 3 Stunden langsam auf RT abkühlen lassen.

Tabelle 11: Ansatz einer Hybridisierungsreaktion.

Hybridisierungsansatz	Volumen [μL]
Markierter Primer	1.5
Templat	7.5
Hybridisierungspuffer	21

Primer-Verlängerungs-Studien

Die Ansätze (Endvolumen 20 μL) für die jeweiligen Assays bestanden aus 2.5 mM dNTPs (natürlich oder modifiziert), 0.02 mM der Hybridisierung und einem 1x Reaktionspuffer. Außerdem wurden die Bedingungen dem jeweiligen Enzym angepasst (Tabelle 12). Nach der entsprechenden Reaktionszeit wurden den Ansätzen 2 μL eines 1.5x RNA-Puffers und 20 μL des Beladungspuffers zugesetzt und die Polymerase durch Erhitzung des Thermoblocks auf 80 °C für 3 Minuten inaktiviert.

Tabelle 12: Reaktionsparameter der Primer-Verlängerungs-Studien.

Verwendete Polymerase	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [min]
Humane DNA Polymerase β	37	45
Humane DNA Polymerase γ	37	45
HIV-RT	37	10

Bei den Positiv-Kontrollen wurden alle natürlichen dNTPs hinzugegeben, wohingegen bei den Negativ-Kontrollen keine Zugabe von dNTPs erfolgte. Zusätzlich wurden Ansätze vorbereitet, die jeweils nur ein natürliches dNTP enthielten. Den Ansätzen der modifizierten Proben wurde statt dem natürlichen Baustein das entsprechend modifizierte Analogon zugeführt.

Im Anschluss wurden die Proben der durchgeführten Assays mittels denaturierender Gelelektrophorese getrennt. Die aufgetragene Probenmenge orientierte sich dabei an der jeweiligen [γ - ^{32}P]-ATP-Aktivität. Die Visualisierung der erhaltenen Ergebnisse konnte durch Autoradiographie realisiert werden.

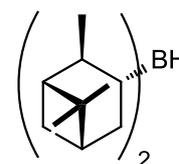
7.3 Chemische Synthesen

Synthese von (-)-Di*sopinocampheyl*boran

Unter Stickstoffatmosphäre wurden zu 16.9 mL (106 mmol, 2.2 Äquiv.) (+)-Pinen langsam 48.0 mL (48.0 mmol, 1.0 Äquiv.) einer 1 M Boran-THF-Lösung bei 0 °C hinzuge tropft. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend über Nacht bei 0 °C gerührt, wobei sich eine farblose Suspension bildete. Aufgrund der Instabilität des (-)-Di*sopinocampheyl*borans wurde auf eine spektroskopische Untersuchung verzichtet und das Rohprodukt direkt zur Hydroborierung eingesetzt.

Summenformel: C₁₉H₃₃B

Molekulargewicht: 272.2763 g/mol



Synthese von (1*S*, 2*R*)-2-(Benzyloxymethyl)-cyclopentenol 29

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 8.0 mL (57.2 mmol, 1.2 Äquiv.) Benzylchlormethylether zu 40 mL THF hinzugefügt. Nach Kühlung auf -60 °C wurden 24 mL (48.0 mmol, 1.0 Äquiv.) einer Natriumcyclopentandienid-Lösung (in THF) hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde nach Zugabe 2 Stunden bei -45 °C gerührt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch auf -72 °C gekühlt und über 2.5 Stunden langsam mit dem frisch dargestellten (-)-Di*sopinocampheyl*boran (50.0 mmol, 1.05 Äquiv.) versetzt. Nach weiteren 1.5 Stunden bei -60 °C wurde die Reaktionslösung über 1.5 Stunden auf 0 °C erwärmt und für weitere 17 Stunden bei dieser Temperatur gerührt.

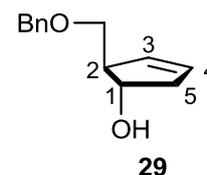
Bei 0 °C erfolgte dann die Zugabe von 14.4 mL einer 3 M Natriumhydroxid-Lösung sowie 14.4 mL einer 30%igen Wasserstoffperoxid-Lösung. Nach weiteren 5 Stunden des Rührens wurde das Reaktionsgemisch mit Ethylacetat extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohgemisch wurde mehrmals säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE, 2:1 v/v).

Ausbeute: 4.03 g (19.7 mmol, 41%) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₁₃H₁₆O₂

Molekulargewicht: 204.2649 g/mol

DC: R_f (PE/EE 2:1, v/v): 0.40



¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 7.38 – 7.28 (m, 5H, *H*-Bn), 5.76 – 5.72 (m, 1H, *H*-3), 5.59 – 5.54 (m, 1H, *H*-4), 4.54 (s, 1H, CH₂-Bn), 4.34 – 4.28 (m, 1H, *H*-1), 3.56 (dd, ²J_{HH} = 9.4 Hz, ³J_{HH} = 5.4 Hz, 1H, O-CH₂a), 3.30 (t, ³J_{HH} = 8.9 Hz, 1H, O-CH₂b), 2.91 – 2.82 (m, 1H, *H*-2), 2.75 – 2.65 (m, 1H, *H*-5a), 2.34 – 2.26 (m, 1H, *H*-5b), 1.97 (bs, 1H, OH).

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 138.4 (C_q-Bn), 130.2 (C-3), 129.4 (C-4), 128.6 (2xC-Bn), 127.8 (C-Bn), 127.8 (2xC-Bn), 76.4 (C-1), 73.4 (CH₂-Bn), 72.3 (O-CH₂), 55.3 (C-2), 41.2 (C-5).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3387, 3060, 3031, 2904, 2854, 1454, 1361, 1097, 1075, 1028, 735, 698.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 227.1048, gefunden: 227.1066.

Synthese von (1*S*,2*R*)-1-Benzyloxy-2-(benzyloxymethyl)-cyclopent-3-en **35**

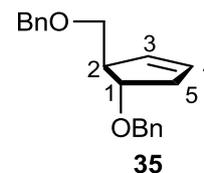
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 361 mg (15.1 mmol 1.2 Äquiv.) Natriumhydrid in 15 mL abs. THF suspendiert. Zu der Suspension wurde bei 0 °C eine Lösung von 2.57 g (12.6 mmol, 1.0 Äquiv.) des D-Cyclopentanol **29**, gelöst in abs. THF, hinzuge tropft. Nach 1 Stunde wurden bei Raumtemperatur langsam 1.9 mL (16.3 mmol, 1.3 Äquiv.) Benzylbromid zum Reaktionsgemisch hinzugegeben. Die Reaktion wurde nach 24 Stunden durch die Zugabe von Eis beendet, mit Ethylacetat extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es erfolgten zwei säulenchromatographische Reinigungen (PE/EE 1:1 v/v und PE/EE 4:1 v/v).

Ausbeute: 3.09 g (10.49 mmol, 84%) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₂₀H₂₂O₂

Molekulargewicht: 294.3875 g/mol

DC: R_f (PE/EE 4:1, v/v): 0.80



¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 7.42 – 7.27 (m, 10H, *H*-Bn), 5.76 (ddd, ³J_{HH} = 6.2 Hz, ³J_{HH} = 4.0 Hz, ⁴J_{HH} = 2.1 Hz, 1H, *H*-3), 5.66 (ddd, ³J_{HH} = 6.5 Hz, ³J_{HH} = 4.3 Hz, ⁴J_{HH} = 2.1 Hz, 1H, *H*-4), 4.62 – 4.47 (m, 4H, CH₂-Bn), 4.09 (dt, ³J_{HH} = 6.8 Hz, ³J_{HH} = 3.2 Hz, 2H, *H*-1), 3.45 (dd, ²J_{HH} = 9.3 Hz, ³J_{HH} = 5.7 Hz, 2H, O-CH₂a), 3.34 (dd, ²J_{HH} = 9.3 Hz, ³J_{HH} = 7.3 Hz, 2H, O-CH₂b), 3.11 – 3.06 (m, 1H, *H*-2), 2.69 (ddq, ²J_{HH} = 17.3 Hz, ³J_{HH} = 6.8 Hz, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, 1H, *H*-5a), 2.46 – 2.37 (m, 2H, *H*-5b).

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 130.1 (*C*-3), 130.0 (*C*-4), 128.5 (2x*C*-Bn), 128.4 (2x*C*-Bn), 127.9 (2x*C*-Bn), 127.7 (2x*C*-Bn), 127.7 (*C*-Bn), 127.5 (*C*-Bn), 81.5 (*C*-1), 73.2 (CH₂-Bn), 71.8 (CH₂-Bn), 70.9 (*C*-6), 53.1 (*C*-2), 39.2 (*C*-5).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3061, 3029, 2854, 1495, 1453, 1358, 1204, 1096, 1070, 1027, 733, 696.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 317.1517, gefunden: 317.1523.

Synthese von (1*R*,3*S*,4*R*)-3-Benzyloxy-4-(benzyloxymethyl)-cyclopentanol **30**

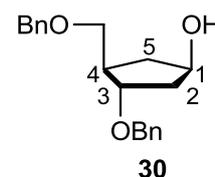
Es wurden 2.17 g (7.37 mmol, 1.0 Äquiv.) des Cyclopentens **35** in 40 mL abs. THF gelöst und bei 0 °C langsam mit 29.5 mL (14.7 mmol, 2.0 Äquiv.) einer 0.5 M 9-BBN-Lösung versetzt. Nach 24 Stunden bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt und es wurden langsam 5.2 mL einer 3 M Natriumhydroxidlösung in Methanol und 5.2 mL einer 30%igen Wasserstoffperoxid-Lösung hinzugegeben. Nach 5 Stunden wurde das Reaktionsgemisch filtriert und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und unter Membranpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohgemisch wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE, 2:1 v/v).

Ausbeute: 1.59 g (5.08 mmol, 69%) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₂₀H₂₄O₃

Molekulargewicht: 312.4028 g/mol

DC: R_f (PE/EE 3:1, v/v): 0.22



¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, CDCl₃): 7.37 – 7.27 (m, 10H, *H*-Bn), 4.53 (s, 2H, CH₂-Bn), 4.47 (dd, ²J_{HH}= 11.7 Hz, ²J_{HH}= 19.0 Hz, 2H, CH₂-Bn) 4.32 (m, 1H, *H*-1), 4.09 (m, 1H, *H*-3), 3.55 (dd, ²J_{HH}= 8.9 Hz, ³J_{HH}= 4.1 Hz, 2H, O-CH₂a), 3.50 (dd, ²J_{HH}= 9.3 Hz, ³J_{HH}= 4.4 Hz, 2H, O-CH₂b), 2.37 – 2.26 (m, 2H, *H*-4, *H*-5a), 2.12 – 2.04 (m, 1H, *H*-2a), 1.89 – 1.84 (m, 1H, *H*-2b), 1.55 – 1.47 (m, 1H, *H*-5b).

¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, CDCl₃): 138.8 (C_q-Bn), 137.9 (C_q-Bn), 128.6 (2x C-Bn), 128.5 (2x C-Bn), 128.0 (C-Bn), 127.9 (2x C-Bn), 127.8 (2x C-Bn), 127.77 (C-Bn), 82.1 (C-1), 73.5 (CH₂-Bn), 72.5 (CH₂-Bn), 72.4 (C-3), 71.6 (O-CH₂), 44.6 (C-4), 42.9 (C-2), 37.5 (C-5).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3412, 3062, 3029, 2928, 2859, 1496, 1453, 1359, 1204, 1096, 1067, 1027, 736, 697.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 335.1623, gefunden: 335.1629.

Synthese von (1*S*,3*S*,4*R*)-3-Benzoyloxy-4-(benzyloxymethyl)-cyclopentanol **31**

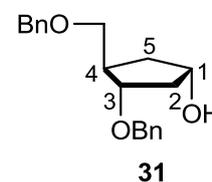
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 1.36 mL (7.8 mmol, 2.0 Äquiv.) DIAD **37** zu 1.81 g (7.8 mmol, 2 Äquiv.) in 80 mL eisgekühltem Diethylether gelöstes Triphenylphosphin **36** getropft und weitere 30 Minuten gerührt. In einem zweiten Reaktionskolben wurden unter Stickstoffatmosphäre 0.84 g (7.8 mmol, 2.0 Äquiv.) Benzoesäure und 1.01 g (3.45 mmol, 1.0 Äquiv.) des Alkohols **30** in 100 mL Diethylether gelöst. Unter Eiskühlung wurde anschließend das Gemisch aus DIAD **37** und Triphenylphosphin **36** zu der zweiten Lösung gegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es erfolgte eine erste säulenchromatographische Reinigung über Kieselgel mit PE/EE (2:1 v/v) als Laufmittel. Nach Entfernung des Laufmittels unter vermindertem Druck wurde das Rohprodukt mit 25 mL einer NaOH/Methanol-Lösung (1%) hydrolysiert. Die Lösung wurde anschließend mit 2 mL HCl (2 M) neutralisiert. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch über Kieselgel mit PE/Aceton (2:1 v/v) als Eluenten.

Ausbeute: 888 mg (2.84 mmol, 83%) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₂₀H₂₄O₃

Molekulargewicht: 312.4028 g/mol

DC: R_f (PE/Aceton 2:1, v/v): 0.46



¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, CDCl₃): 7.38 – 7.25 (m, 10H, *H*-Bn), 4.58 – 4.46 (m, 4H, 2x CH₂-Bn), 4.31 – 4.26 (m, 1H, *H*-1), 4.00- 3.96 (m, 1H, *H*-3), 3.42 (dd, ²*J*_{HH}= 9.3 Hz, ³*J*_{HH}= 5.5 Hz, 1H, O-CH₂a), 3.27 (dd, ²*J*_{HH}= 9.5 Hz, ³*J*_{HH}= 7.5 Hz, 1H, O-CH₂b), 2.70 – 2.63 (m, 1H, *H*-4), 2.10 – 1.97 (m, 2H, *H*-2a, *H*-5a), 1.88 – 1.82 (m, 1H, *H*-2b), 1.55 (ddd, ²*J*_{HH}= 14.0 Hz, ³*J*_{HH}= 7.5 Hz, ³*J*_{HH}= 5.2 Hz, 1H, *H*-5b).

¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, CDCl₃): 138.5 (C_q-Bn), 138.4 (C_q-Bn), 128.5 (4xC-Bn), 127.8 (2xC-Bn), 127.7 (C-Bn), 127.7 (C-Bn), 127.6 (2xC-Bn), 83.2 (C-1), 73.9 (CH₂-Bn), 73.1 (CH₂-Bn), 72.3 (C-3), 70.9 (O-CH₂), 44.2 (C-4), 40.5 (C-2), 38.1 (C-5).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3418, 3030, 293, 2858, 1496, 1454, 1360, 1309, 1205, 1091, 1071, 1028, 986, 736, 697.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 335.1623, gefunden: 335.1629.

Synthese von D-3', 5'-Di-O-benzyl-carba-thymidin **32**

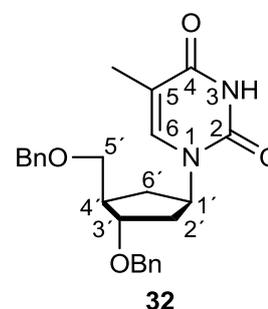
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 1.89 mL (9.62 mmol, 3.25 Äquiv.) DIAD **37** zu 2.71 g (10.3 mmol, 3.5 Äquiv.) in 40 mL eisgekühltem Acetonitril gelöstes Triphenylphosphin **36** getropft. In einem zweiten Reaktionskolben wurden unter Stickstoffatmosphäre 1.58 g (6.87 mmol, 2.3 Äquiv.) *N*3-Benzoylthymidin und 925 mg (2.96 mmol, 1.0 Äquiv.) des Alkohols **31** in 30 mL Acetonitril gelöst. Bei -50 °C wurde anschließend das Gemisch aus DIAD **37** und Triphenylphosphin **36** tropfenweise zu der zweiten Lösung gegeben und dann auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktionsverfolgung erfolgte dünnschichtchromatographisch (PE/EE 1:2 v/v). Es schloss sich eine säulenchromatographische Reinigung über Kieselgel mit PE/EE (2:1 v/v) als Laufmittel an. Nach Entfernung des Laufmittels wurde das Rohprodukt mit 25 mL einer NaOH/Methanol-Lösung (1%) hydrolysiert. Die Lösung wurde anschließend mit 2 mL HCl (2 M) neutralisiert. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch über Kieselgel mit PE/EE->CH₂Cl₂/MeOH (1:2 -> 19:1 v/v) als Eluenten.

Ausbeute: 700 mg (1.66 mmol, 56%) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₂₅H₂₈N₂O₄

Molekulargewicht: 420.5008 g/mol

DC: R_f (PE/EE 3:1, v/v): 0.15



$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, CDCl_3): 8.72 (bs, 1H, NH), 7.40 – 7.23 (m, 10H, *H*-Bn), 7.09 (d, $^4J_{\text{HH}} = 1.4$ Hz, 1H, *H*-6), 5.17 – 5.09 (m, 1H, *H*-1), 4.58 – 4.43 (m, 4H, 2x CH_2 -Bn), 3.99 (dt, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.2$ Hz, 1H, *H*-3'), 3.59 (dd, $^2J_{\text{HH}} = 9.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4.7$ Hz, 1H, *H*-5'a), 3.54 (dd, $^2J_{\text{HH}} = 8.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4.7$ Hz, 1H, *H*-5'b), 2.44 – 2.29 (m, 2H, *H*-4'a, *H*-6'a), 2.24 – 2.15 (m, 1H, *H*-2'a), 2.02 – 1.91 (m, 1H, *H*-2'b), 1.78 (d, $^4J_{\text{HH}} = 1.2$ Hz, 3H, CH_3 -Thymin), 1.66 – 1.59 (m, 1H, *H*-6'b).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, CDCl_3): 163.7 (*C*-4), 151.0 (*C*-2), 138.4 (C_q -Bn), 138.3 (C_q -Bn), 137.3 (*C*-6), 128.6 (2x *C*-Bn), 128.5 (2x *C*-Bn), 127.9 (*C*-Bn), 127.8 (5x *C*-Bn), 111.0 (*C*-5), 80.7 (*C*-3'), 73.5 (*C*-5'), 71.7 (CH_2 -Bn), 71.2 (CH_2 -Bn), 55.0 (*C*-1'), 44.7 (*C*-4'), 36.9 (*C*-2'), 32.2 (*C*-6'), 12.5 (CH_3 -Thymin).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3180, 3032, 2925, 2858, 1683, 1470, 1454, 1272, 1092, 737, 698.

HR-ESI⁺-MS: (*m/z*) berechnet für $[\text{M}+\text{H}^+]$: 421.2127, gefunden: 421.2122.

Synthese von D-*carba*-Thyminidin 16

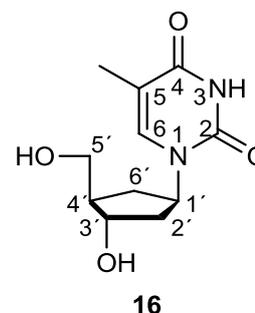
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 721 mg (1.71 mmol) des geschützten Nucleosids **32** in 11 mL Methanol gelöst und mit katalytischen Mengen von Pd/Aktivkohle versetzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung einem Wasserstoffstrom ausgesetzt. Nach drei Tagen wurde die Reaktionslösung über *Celite*[®] filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch über Kieselgel mit DCM/MeOH (9:1 v/v) als Laufmittel.

Ausbeute: 338 mg (1.41 mmol, 82%) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$

Molekulargewicht: 240.2557 g/mol

DC: R_f (DCM/MeOH 9:1, v/v): 0.12



$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, MeOD): 7.51 (d, $^4J_{\text{HH}} = 1.2$ Hz, 1H, *H*-6), 5.11 – 5.00 (m, 1H, *H*-1), 4.17 (ddd, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 4.6$ Hz, 1H, *H*-3'), 3.69 (dd, $^2J_{\text{HH}} = 11.1$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 6.2$ Hz, 1H, *H*-5'b), 3.62 (dd, $^2J_{\text{HH}} = 10.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.3$ Hz, 1H, *H*-5'a), 2.30 – 2.17 (m, 1H, *H*-6'a), 2.16 – 2.02 (m, 2H, *H*-2'a, *H*-4'), 2.01 – 1.90 (m, 1H, *H*-2'b), 1.88 (d, $^4J_{\text{HH}} = 1.1$ Hz, 3H, CH_3 -Thymin), 1.64 – 1.54 (m, 1H, *H*-6'b).

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, MeOD): 166.6 (C-2), 153.3 (C-4), 140.0 (C-6), 111.8 (C-5), 73.8 (C-3'), 64.5 (C-5'), 56.1 (C-1'), 50.1 (C-4'), 40.2 (C-2'), 33.7 (C-6'), 12.5 (CH₃-Thymin).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3391, 3036, 2930, 1673, 1474, 1420, 1396, 1371, 1274, 1224, 1045.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+H⁺]: 241.1188, gefunden: 241.1185.

Synthese von D-carba-Thymin-5'-triphosphat **24**

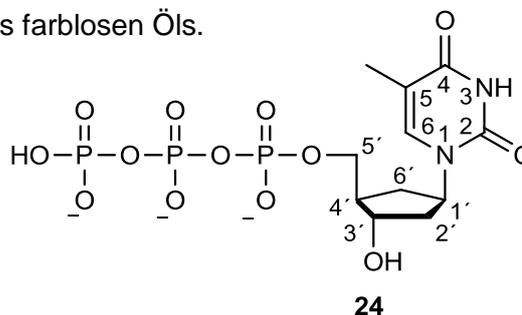
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 88 mg (0.36 mmol, 1.3 Äquiv.) des 5-Chlor-saligenylphosphorchloridats **50** für 1.5 Stunden im Vakuum vorgetrocknet und anschließend in 5 mL abs THF gelöst. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden unter Stickstoffatmosphäre 68 mg (0.28 mmol, 1.0 Äquiv.) D-carba-dT **16** zweimal mit abs. Pyridin coevaporiert, in 2 mL abs. Pyridin gelöst und auf -40 °C gekühlt. Innerhalb einer Stunde wurde das gelöste Chloridat zu D-carba-dT **16** hinzuge tropft. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für 2 Tage gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 Tropfen Methanol beendet. Unter Inertgasatmosphäre wurden die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rückstandes erfolgte säulenchromatographisch über Kieselgel mit DCM/MeOH/Essigsäure (9:1 v/v + 0.1%) als Laufmittel.

Im Anschluss wurden 40 mg (91 µmol, 1.0 Äquiv.) des isolierten 5-Chlor-cycloSal-Triesters **51** und 142 mg (0.18 mmol, 2.0 Äquiv.) Tetrabutylammonium-Pyrophosphatsalz unter Stickstoffatmosphäre separat für 4 Stunden im Vakuum vorgetrocknet. Danach wurde der Triester **51** in 3 mL abs. DMF gelöst. Das Phosphatsalz wurde in 1.2 mL abs. DMF gelöst und bei Raumtemperatur langsam zu der Lösung von **51** hinzuge tropft. Nach 20 Stunden wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch über RP-18-Kieselgel.

Ausbeute: 22 mg (22 µmol, 8% über 2 Stufen) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₁₁H₁₆N₂O₁₃P₃³⁻

Molekulargewicht: 477. 1733 g/mol



¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, D₂O): 7.60 (s, 1H, *H*-6), 5.12 – 5.00 (m, 1H, *H*-1), 4.42 – 4.34 (m, 1H, *H*-3'), 4.15 – 4.00 (m, 2H, *H*-5'), 3.27 - 3.11 (m, 26H, *H*-A), 2.36 – 2.21 (m, 2H, *H*-4', *H*-6'a), 2.20 – 2.10 (m, 1H, *H*-2'a), 2.10 – 2.00 (m, 1H, *H*-2'b), 1.90 (s, 3H, CH₃-Thymin), 1.71 - 1.60 (m, 27H, *H*-B), 1.42 – 1.30 (sext, ³*J*_{HH}= 7.4 Hz, 26H, *H*-C), 0.99 – 0.90 (t, ³*J*_{HH}= 7.1 Hz, 39H, *H*-D).

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, D₂O): 139.7 (C-6), 110.9 (C-5), 72.0 (C-3'), 65.6 (C-5'), 58.1 (C-A), 53.9 (C-1'), 46.2 (C-4'), 37.9 (C-2'), 31.6 (C-6'), 23.1 (C-B), 19.1 (C-C), 12.8 (C-D), 11.4 (CH₃-Thymin).

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, D₂O): -10.61, -10.96, -23.25.

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3345, 3309, 3273, 3217, 2961, 2876, 1688, 1487, 1467, 1382, 1230, 1098, 1071, 938, 886, 518, 419.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+H]⁺: 479.0027, gefunden: 479.0071.

Synthese von 5'-O-(DMTr)-D-carba-dT **56**

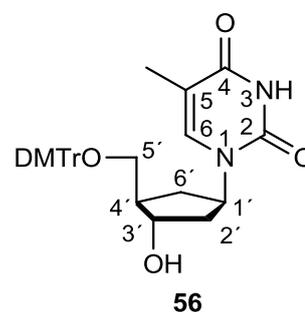
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 99 mg (0.41 mmol, 1.0 Äquiv.) D-carba-dT **16** dreimal mit Pyridin coevaporiert. Nach Zugabe von 15 mL abs. Pyridin und 139 mg (0.41 mmol, 1.0 Äquiv.) DMTr-chlorid wurde das Reaktionsgemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Da sich dünnschichtchromatographisch unverbrauchtes Edukt detektieren ließ, wurden weitere 0.2 Äquiv. DMTr-chlorid hinzugegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe einer gesättigten Natriumcarbonatlösung beendet. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH/Triethylamin 98:2 v/v + 0.1%) gereinigt.

Ausbeute: 145 mg (0.27 mmol, 64%) eines leicht verunreinigten gelblichen Feststoffes.

Summenformel: C₃₂H₃₄N₂O₆

Molekulargewicht: 542.2417 g/mol

DC: R_f (DCM/MeOH/Triethylamin 98:2:0.1%, v/v): 0.33



¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CD₃CN): 7.48 – 7.43 (m, 2H, *H*-DMTr), 7.35 – 7.28 (m, 6H, *H*-DMTr), 7.26 – 7.21 (m, 1H, *H*-DMTr), 7.16 (d, ⁴*J*_{HH} = 1.3 Hz, 1H, *H*-6), 6.91 – 6.85 (m, 4H, *H*-DMTr), 5.04 – 4.96 (m, 1H, *H*-1), 4.17 – 4.07 (m, 1H, *H*-3'), 3.78 (s, 6H, OCH₃), 3.13 (dd, ²*J*_{HH} = 5.8 Hz, ³*J*_{HH} = 2.8 Hz, 2H, *H*-5'), 2.27 – 2.17 (m, 2H, *H*-4', *H*-6'a), 1.93 – 1.87 (m, 1H, *H*-2'a), 1.77 (s, 3H, CH₃-Thymin), 1.50 – 1.40 (m, 1H, *H*-2'b).

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, D₂O): 160.0 (C-DMTr), 146.5 (C-DMTr), 138.7 (C-6), 131.1 (C-DMTr), 130.0 (C-DMTr), 129.1 (C-DMTr), 128.9 (C-DMTr), 127.8 (C-DMTr), 114.1 (C-DMTr), 73.8 (C-3'), 65.7 (C-5'), 55.9 (C-DMTr), 54.7 (C-1'), 48.3 (C-4'), 39.9 (C-2'), 34.1 (C-6'), 12.5 (CH₃-Thymin).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3348, 3184, 3036, 2931, 1678, 1607, 1508, 1465, 1445, 1297, 1248, 1175, 1069, 1032, 828, 703, 584.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 565.2315, gefunden: 565.2499.

Synthese von 3'-O-[(2-Cyanoethoxy)-(N,N'-diisopropylamino)-phosphinyl]-5'-O-(DMTr)-D-carba-dT **25**

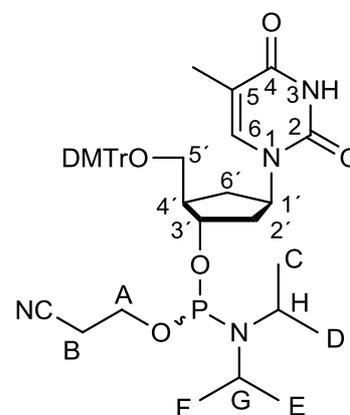
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 118 mg (0.22 mmol, 1.0 Äquiv.) 5'-O-(DMTr)-D-carba-dT **56** in Dichlormethan und Acetonitril (je 7.5 mL) gelöst und mit 27 mg (0.22 mmol, 1.0 Äquiv.) DCI versetzt. Dem Reaktionsgemisch wurden unter Rühren bei Raumtemperatur tropfenweise 0.1 mL (0.35 mmol, 1.6 Äquiv.) hinzugegeben. Nach 4 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe einer gesättigten Natriumhydrogencarbonatlösung beendet und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Hexan/EE/Triethylamin 1:4:0.2%) gereinigt.

Ausbeute: 149 mg (0.20 mmol, 91%) eines farblosen Feststoffes.

Summenformel: C₄₁H₅₁N₄O₇P

Molekulargewicht: 742.8400 g/mol

DC: R_f (Hexan/EE/Triethylamin 1:4:0.2%, v/v): 0.51



25

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CD₃CN): 7.47 – 7.41 (m, 4H, *H*-DMTr), 7.35 – 7.28 (m, 12H, *H*-DMTr), 7.25 – 7.20 (m, 2H, *H*-DMTr), 7.17 (s, 2H, *H*-6), 6.91 – 6.85 (dd, ²*J*_{HH}= 9.0 Hz, ³*J*_{HH}= 7.0 Hz, 8H, *H*-DMTr), 5.02 – 4.94 (m, 2H, *H*-1), 4.38 – 4.23 (m, 2H, *H*-3'), 3.78 (d, ⁴*J*_{HH}= 2.1 Hz, 12H, OCH₃), 3.71 – 3.60 (m, 4H, *H*-H, *H*-G), 3.58 – 3.49 (m, 4H, *H*-A), 3.24 -3.05 (m, 4H, *H*-5'), 2.61 2.48 (m, 4H, *H*-B), 2.33 – 2.23 (m, 4H, *H*-4', *H*-6'a), 2.14 (s, 4H, *H*-2'), 1.77 (s, 6H, CH₃-Thymin), 1.19 – 1.00 (m, 24H, *H*-C, *H*-D, *H*-E, *H*-F).

³¹P-NMR: δ [ppm] (162 MHz, CD₃CN): 147.2, 147.0

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3179, 3055, 2965, 2932, 2835, 1686, 1608, 1509, 1465, 1296, 1250, 1178, 1069, 1032, 977, 829.

HR-ESI⁺-MS: Während der Proben-Präparation (mit Säurezusatz) erfolgte die Oxidation zum entsprechenden Phosphonat, daher indirekte Bestimmung: (*m/z*) berechnet für [M_{ox}+Na⁺]: 682.2294, gefunden: 682.2289.

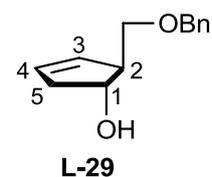
Synthese von (1*R*, 2*R*)-2-(Benzyloxymethyl)-cyclopent-3-enol L-29

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 6.7 mL (48.2 mmol, 1.2 Äquiv.) Benzylchlormethylether zu 40 mL THF hinzugefügt. Nach Kühlung auf -60 °C wurden 20 mL (40 mmol, 1.0 Äquiv.) einer Natriumcyclopentandienidlösung (in THF) hinzugetropft. Die Reaktionslösung wurde nach Zugabe 2 Stunden bei -45 °C gerührt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch auf -72 °C gekühlt und über 2.5 Stunden langsam mit dem frisch dargestellten (-)-Diisopinocampheylboran (50.0 mmol, 1.05 Äquiv.) versetzt. Nach weiteren 1.5 Stunden bei -60 °C wurde die Reaktionslösung über 1.5 Stunden auf 0 °C erwärmt und weitere 17 Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Bei weiterhin 0 °C erfolgte dann die Zugabe von 12 mL einer 3 M Natriumhydroxid-Lösung sowie 12 mL von einer 30%igen Wasserstoffperoxid-Lösung. Nach weiteren 5 Stunden wurde das Reaktionsgemisch mit Ethylacetat extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohgemisch wurde mehrmals säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 4:1 v/v).

Ausbeute: 4.07 g (19.9 mmol, 50%) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₁₃H₁₆O₂

Molekulargewicht: 204.2649 g/mol



Die analytischen Daten stimmen mit den oben genannten Ergebnissen für D-**29** überein.

Synthese von (1*R*,2*S*)-2-(Benzyloxymethyl)-cyclopent-3-enylmethansulfonat 98

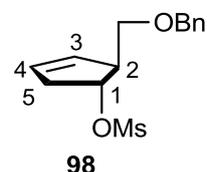
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 8.67 g (42.5 mmol, 1.0 Äquiv.) (1*R*,2*S*)-2-(Benzyloxymethyl)cyclopent-3-enol L-**29** in 75 mL abs. THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden 6.57 mL (46.7 mmol, 1.1 Äquiv.) Triethylamin zugegeben und unter Rühren 3.62 mL (46.7 mmol, 1.1 Äquiv.) Methansulfonylchlorid langsam hinzugegeben. Die Reaktionsverfolgung erfolgte dünnschichtchromatographisch (PE/EE 2:1) und die Reaktion wurde nach 1.5 h durch die Zugabe von Eis beendet. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 3:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 10.76 g (3.18 mmol, 90%) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₁₄H₁₈O₄S

Molekulargewicht: 282.3553 g/mol

DC: R_f (PE/EE 4:1 v/v): 0.40



¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, CDCl₃): 7.37 – 7.27 (m, 5H, *H*-Bn), 5.79 – 5.75 (m, 1H, *H*-4), 5.64 – 5.61 (m, 1H, *H*-3), 5.18 (dt, ³J_{HH}= 7.1 Hz, ³J_{HH}= 3.0 Hz, 1H, *H*-1), 4.53 (d, ⁴J_{HH}= 2.5 Hz, 2H, CH₂-Bn), 3.57 (dd, ²J_{HH}= 9.3 Hz, ³J_{HH}= 4.8 Hz, 1H, O-CH₂a), 3.32 (dd, ²J_{HH}= 8.9 Hz, ³J_{HH}= 7.8 Hz, 1H, O-CH₂b), 3.20 – 3.17 (m, 1H, *H*-2), 2.96 (s, 3H, CH₃-Ms), 2.94 – 2.91 (m, 1H, *H*-5a), 2.90 – 2.87 (m, 1H, *H*-5b).

¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, CDCl₃): 138.1 (C_q-Bn), 129.6 (C-4), 129.1 (C-3), 128.6 (2xC-Bn), 128.0 (C-Bn), 127.9 (2xC-Bn), 83.9 (C-1), 73.5 (CH₂-Bn), 70.2 (O-CH₂), 53.5 (C-2), 40.1 (C-5), 38.3 (CH₃-Ms).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3061, 3029, 2937, 1353, 1179, 1168, 1096, 958, 898, 874, 741, 700, 527.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 305.0823, gefunden: 305.0813.

Synthese von (1*R*,2*S*,4*S*)-2-(Benzyloxymethyl)-4-hydroxy-cyclopentenylmethansulfonat **102**

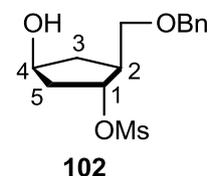
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 2.83 g (10.0 mmol, 1.0 Äquiv.) des Cyclopentens **98** in 8 mL abs. THF gelöst und unter Rühren langsam bei 0 °C mit 40.1 mL (20.0 mmol, 2.0 Äquiv.) einer 0.5 M Lösung von 9-BBN in THF versetzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde langsam eine Lösung bestehend aus 9.24 g (30.0 mmol, 3.0 Äquiv.) Oxone® in 40 mL Wasser bei 0°C hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde weitere 7.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung filtriert und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 1:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 1.20 g (4.00 mmol, 40%) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₁₄H₂₀O₅S

Molekulargewicht: 300.3706 g/mol

DC: R_f (PE/EE 3:1, v/v): 0.35



¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, CDCl₃): 7.37 – 7.28 (m, 5H, *H*-Bn), 5.17 – 5.12 (m, 1H, *H*-1), 4.61 – 4.53 (m, 2H, CH₂-Bn), 4.37 – 4.33 (m, 1H, *H*-4), 3.70 – 3.67 (m, 1H, O-CH₂a), 3.50 (dd, ²J_{HH} = 9.0 Hz, ³J_{HH} = 5.0 Hz, 1H, O-CH₂b), 2.94 (d, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, 3H, CH₃-Ms), 2.53 – 2.47 (m, 1H, *H*-2), 2.35 – 2.28 (m, 1H, *H*-3a), 2.26 – 2.20 (m, 1H, *H*-5a), 2.11 – 2.06 (m, 1H, *H*-5b), 1.58 – 1.52 (m, 1H, *H*-3b).

¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, CDCl₃): 137.4 (C_q-Bn), 128.7 (2xC-Bn), 128.2 (C-Bn), 128.1 (2xC-Bn), 85.0 (C-1), 73.7 (CH₂-Bn), 71.6 (C-4), 71.0 (O-CH₂), 44.7 (C-2), 43.5 (C-5), 38.2 (CH₃-Ms), 37.0 (C-3).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3415, 3029, 2938, 2864, 1454, 1350, 1173, 1092, 1027, 961, 916, 861, 747, 701, 527.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 323.0929, gefunden: 323.0802.

Synthese von (1S,4R)-4-(Benzyloxymethyl)-cyclopent-2-enol 103**Variante 1:**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 1.12 g (3.9 mmol, 1.0 Äquiv.) des Methansulfonats **102** in 24 mL abs. DMF gelöst und mit 0.67 g (5.94 mmol, 1.5 Äquiv.) Kalium-*tert*-butylat versetzt. Die Reaktionslösung wurde bei 120 °C für 20 min gerührt. Der Reaktionsansatz wurde in 40 mL eines Wasser/Ethylacetat-Gemisches (1:1) gegeben und die organische Phase anschließend dreimal mit Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden ergänzend dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der bräunliche Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 6:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 405 mg (1.98 mmol, 50%) eines farblosen Öls.

Variante 2:

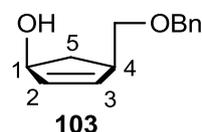
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 257 mg (0.86 mmol, 1.0 Äquiv.) des Methansulfonats **102** in 4 mL abs. DMF gelöst. Nach Zugabe von 87 mg (1.3 mmol, 1.5 Äquiv.) Imidazol und 155 mg (1.03 mmol, 1.2 Äquiv.) TBDMS-Cl wurde das Reaktionsgemisch 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach 18 Stunden wurden dem Reaktionsgemisch 116 mg (1.01 mmol, 1.2 Äquiv.) Kalium-*tert*-butylat hinzugefügt. Nach weiteren 6 Stunden wurde das Reaktionsgemisch in 10 mL eines Wasser/Ethylacetat-Gemisches (1:1) gegeben und die organische Phase dreimal mit Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der bräunliche Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 4:1 -> 2:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 87 mg (0.43 mmol, 50%) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₁₃H₁₆O₂

Molekulargewicht: 204.2649 g/mol

DC: R_f (PE/EE 6:1 v/v): 0.13



¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 7.37 – 7.28 (m, 5H, *H*-Bn), 5.98 – 5.94 (m, 1H, *H*-4), 5.84 – 5.80 (dd, ³*J*_{HH} = 5.7 Hz, ³*J*_{HH} = 2.6 Hz, 1H, *H*-3), 4.64 – 4.60 (m, 1H, *H*-1), 4.53 (d, ³*J*_{HH} = 3.0 Hz, 2H, CH₂-Bn), 3.46 (dd, ³*J*_{HH} = 3.2 Hz, ⁴*J*_{HH} = 1.5 Hz, 2H, O-CH₂), 2.88 – 2.81 (m, 1H, *H*-4), 2.32 (ddd, ²*J*_{HH} = 14.1 Hz, ³*J*_{HH} = 8.8 Hz, ³*J*_{HH} = 7.3 Hz, 1H, *H*-5a), 1.61- 1.55 (m, 1H, *H*-5b).

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 137.8 (C_q-Bn), 135.3 (C-2), 135.1 (C-3), 128.6 (2xC-Bn), 128.0 (3xC-Bn), 75.9 (C-1), 73.6 (CH₂-Bn), 71.5 (O-CH₂), 44.7 (C-4), 37.5 (C-5).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3410, 3059, 2931, 2857, 1454, 1362, 1091, 1054, 1027, 738, 698.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 227.1048, gefunden: 227.1046.

Synthese von (1*R*,4*R*)-4-(Benzyloxymethyl)-cyclopent-2-enol **105**

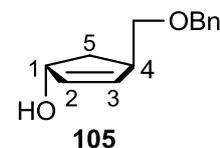
Unter Stickstoffatmosphäre wurden bei 0 °C 119 µL (0.61 mmol, 2.0 Äquiv.) DIAD **37** zu 159 mg (0.61 mmol, 2.0 Äquiv.) Triphenylphosphin **36**, gelöst in abs. Diethylether, getropft und 30 Minuten gerührt. In einem zweiten Reaktionskolben wurden unter Stickstoffatmosphäre 74 mg (0.61 mmol, 2.0 Äquiv.) Benzoesäure und 62 mg (0.30 mmol, 1.0 Äquiv.) des (1*S*,4*R*)-4-(Benzyloxymethyl)-cyclopent-2-enol **103** in abs. Diethylether gelöst. Unter Eiskühlung wurde anschließend das Gemisch aus DIAD **37** und Triphenylphosphin **36** zu der zweiten Lösung gegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung über Kieselgel mit PE/EE (2:1) als Laufmittel. Nach Entfernung des Laufmittels wurde das Rohprodukt mit 25 mL einer NaOH/Methanol-Lösung (1%) hydrolysiert. Die Lösung wurde anschließend mit 2 mL HCl (2 M) neutralisiert. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch über Kieselgel mit PE/EE (2:1 v/v) als Laufmittel.

Ausbeute: 56 mg (0.27 mmol, 90%) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₁₃H₁₆O₂

Molekulargewicht: 204.2649 g/mol

DC: R_f (PE/EE 6:1 v/v): 0.18



¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, CDCl₃): 7.39 – 7.28 (m, 5H, *H*-Bn), 6.01 (dd, ³*J*_{HH} = 5.8 Hz, ³*J*_{HH} = 1.8 Hz, 1H, *H*-2), 5.93 – 5.89 (m, 1H, *H*-3), 4.93 – 4.88 (m, 1H, *H*-1), 4.53 (s, 2H, CH₂-Bn), 4.37 – 4.33 (m, 1H, *H*-4), 3.37 (dq, ²*J*_{HH} = 9.0 Hz, ³*J*_{HH} = 7.1 Hz, 1H, O-CH₂), 2.02 – 1.95 (ddd, ²*J*_{HH} = 12.0 Hz, ³*J*_{HH} = 6.9 Hz, ³*J*_{HH} = 5.1 Hz, 1H, *H*-5a), 1.93 – 1.84 (ddd, ²*J*_{HH} = 10.8 Hz, ³*J*_{HH} = 7.5 Hz, ³*J*_{HH} = 3.0 Hz, 1H, *H*-5b).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, CDCl_3): 138.5 ($\text{C}_q\text{-Bn}$), 137.1 (C-2), 134.5 (C-3), 128.5 ($2\times\text{C-Bn}$), 127.7 ($3\times\text{C-Bn}$), 77.2 (C-1), 74.1 (O-CH_2), 73.3 ($\text{CH}_2\text{-Bn}$), 45.1 (C-4), 37.6 (C-5).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] 33774, 3061, 3031, 2923, 2854, 1454, 1361, 1091, 1074, 1028, 737, 698.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für $[\text{2M-H}_2\text{O}+\text{Na}^+]$: 413.2093, gefunden: 413.2074.

Synthese von (1*R*,4*R*)-4-(Benzyloxymethyl)-cyclopent-2-en-benzoat **106**

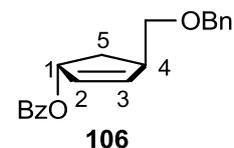
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 213 mg (0.81 mmol, 2.0 Äquiv.) Triphenylphosphin **36** in 8 mL abs. Diethylether suspendiert und bei 0 °C mit 0.16 mL (0.81 mmol, 2.0 Äquiv.) DIAD **37** versetzt. Nach einer Stunde bei 0 °C wurde dieser Komplex zu einer Lösung aus 83 mg (0.41 mmol, 1.0 Äquiv.) des Cyclopentenols **105** und 100 mg (0.810 mmol, 2.0 Äquiv.) Benzoesäure, in abs. Diethylether, gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Rückstand durch Filtration isoliert, mit Diethylether gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (PE/EE 15:1 v/v).

Ausbeute: 96 mg (0.31 mmol, 115%) eines farblosen Öls, welches jedoch mit DIAD verunreinigt vorlag.

Summenformel: $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_3$

Molekulargewicht: 308.3710 g/mol

DC: R_f (PE/EE 15:1, v/v): 0.41



$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3): 8.05 – 8.00 (m, 2H, $H\text{-Bz}$), 7.57 – 7.50 (m, 1H, $H\text{-Bz}$), 7.45 – 7.38 (m, 2H, $H\text{-Bz}$), 7.37 – 7.28 (m, 5H, $H\text{-Bn}$), 6.16 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 5.4$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, 1H, $H\text{-3}$), 6.03 – 5.99 (m, 1H, $H\text{-2}$), 5.98 – 5.92 (m, 1H, $H\text{-1}$), 4.54 (s, 2H; $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 3.43 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 1.7$ Hz, 2H, O-CH_2), 3.32 – 3.21 (m, 1H, $H\text{-4}$), 2.17 – 2.10 (m, H, $H\text{-5}$).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, CDCl_3): 139.6 (C-3), 132.9 (C-Bz), 130.7 (C-2), 129.7 ($2\times\text{C-Bz}$), 128.6 ($2\times\text{C-Bz}$), 128.4 (C-Bn), 127.8 (C-Bn), 80.7 (C-1), 73.8 (O-CH_2), 73.3 ($\text{CH}_2\text{-Bn}$), 45.4 (C-4), 34.3 (C-5).

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für $[\text{M}+\text{Na}^+]$: 331.1310, gefunden: 331.1275.

Versuch der Darstellung von *N*3-Benzoyl-5'-O-benzyl-L-*carba*-ribothymidin 115

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 1.82 mL (9.2 mmol, 2.8 Äquiv.) DIAD **37** zu 2.59 g (9.87 mmol, 2.0 Äquiv.) in 60 mL eisgekühltem Acetonitril gelöstes Triphenylphosphin **36** getropft und weitere 40 Minuten gerührt. In einem zweiten Reaktionskolben wurden unter Stickstoffatmosphäre 1.52 g (6.58 mmol, 2.0 Äquiv.) *N*3-Benzoylthymidin und 671 mg (3.29 mmol, 1.0 Äquiv.) des Alkohols **105** in 30 mL Acetonitril gelöst. Bei -50 °C wurde anschließend das Gemisch aus DIAD und Triphenylphosphin tropfenweise zu der zweiten Lösung gegeben und für 2 Stunden bei -40 °C gerührt und dann auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktionsverfolgung erfolgte dünnschichtchromatographisch (PE/EE 1:1) und wurde nach 4 Tagen beendet. Es erfolgten mehrere säulenchromatographische Reinigungen über Kieselgel mit PE/EE (1:1) als Laufmittel.

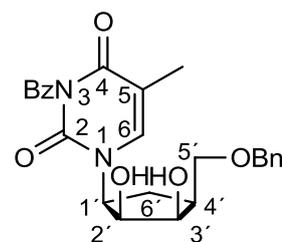
Im nächsten Reaktionsschritt wurden in 9 mL eines Gemisches aus *tert*-Butanol und Wasser (2:1 v/v) 396 mg (0.951 mmol, 1.0 Äquiv.) des leicht verunreinigten Nucleosids **106** gelöst. Dazu wurden 90.5 mg (0.950 mmol, 1.0 Äquiv.) Methansulfonamid und 1.33 g AD-Mix α (1.4 g pro 1 mmol Olefin) gegeben. Nach 10 Tagen wurde die Reaktion durch die Zugabe einer gesättigten Natriumhydrogensulfidlösung beendet. Nach Phasenseparation wurde die wässrige Phase dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 1:2 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 200 mg (0.44 mmol, 47%) eines verunreinigten Feststoffs.

Summenformel: C₂₅H₂₆N₂O₆

Molekulargewicht: 450.4837 g/mol

DC: R_f (PE/EE 1:2 v/v): 0.60



¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, DMSO): 7.95 (s, 1H, *H*-6), 7.93 - 7.89 (m, 2H, *H*-Bz), 7.80 - 7.75 (m, 1H, *H*-Bz), 7.63 - 7.57 (t, ³J_{HH} = 7.8 Hz, 2H, *H*-Bz), 7.38 - 7.27 (m, 5H, *H*-Bn), 4.97 (dd, ²J_{HH} = 17.3 Hz, ³J_{HH} = 8.7 Hz, 1H, *H*-1'), 4.55 - 4.48 (m, 2H, CH₂-Bn), 4.10 (dd, ³J_{HH} = 8.9 Hz, ³J_{HH} = 4.0 Hz, 1H, *H*-2'), 3.96 (t, ³J_{HH} = 3.9 Hz, 1H, *H*-3'), 3.71 (dd, ²J_{HH} = 9.3 Hz, ³J_{HH} = 6.8 Hz, 1H, *H*-5'a), 3.45 (dd, ²J_{HH} = 9.2 Hz, ³J_{HH} = 6.5 Hz, 1H, *H*-5'b), 2.17 - 2.08 (m, 2H, *H*-4', *H*-6'a), 1.83 (s, 3H, CH₃-Thymin), 1.69 - 1.60 (m, 1H, *H*-6'b).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, DMSO): 169.9 ($\text{C}_q\text{-Bz}$)*, 142.4 (C-6), 138.7 ($\text{C}_q\text{-Bn}$), 135.3 (C-Bz), 130.2 (2xC-Bz), 139.4 (2xC-Bz), 128.6 (2xC-Bn), 127.4 (2xC-Bn), 127.3 (C-Bn), 106.8 (C-5), 72.1 ($\text{CH}_2\text{-Bn}$), 71.2 (C-2'), 71.0 (C-3'), 69.4 (C-5'), 54.0 (C-1'), 39.0 (C-4'), 32.2 (C-6'), 12.2 ($\text{CH}_3\text{-Thymin}$).

*aus dem HMBC-Spektrum bestimmt.

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3425, 2925, 1764, 1694, 1650, 1447, 1391, 1257, 1101, 980, 737, 483.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für $[\text{M}+\text{H}^+]$: 451.1869, gefunden: 451.1864.

Versuch der Darstellung von **N3-Benzoyl-(3',5'-O-(tetraisopropylidisiloxy))-L-carbaribothymidin 95**

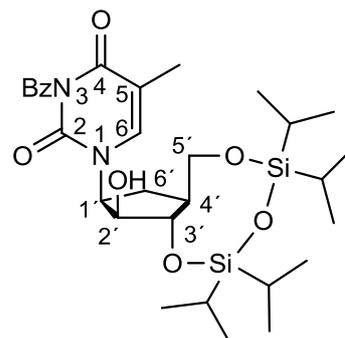
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 32 mg (71 μmol , 1.0 Äquiv.) des benzylgeschützten Nucleosids **115** in 5 mL Methanol gelöst und mit katalytischen Mengen von Pd/Aktivkohle versetzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung einem Wasserstoffstrom ausgesetzt. Nach 21 Stunden wurde die Reaktionslösung über *Celite*[®] filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Im nächsten Reaktionsschritt wurden unter Stickstoffatmosphäre 21 mg (58 μmol , 1.0 Äquiv.) von **118** in 4 mL abs. Pyridin gelöst und bei $-30\text{ }^\circ\text{C}$ mit 20 μL (64 μmol , 1.1 Äquiv.) TIPDS-chlorid versetzt. Die Reaktionsverfolgung erfolgte dabei dünnschichtchromatographisch (PE/EE 1:3 v/v). Die Reaktion wurde nach 25 Stunden beendet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Reaktionsgemisch dreimal mit Toluol coevaporiert. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 1:2 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 15 mg (26 μmol , 44%) eines verunreinigten Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_7\text{Si}_2$

Molekulargewicht: 602.8664 g/mol



$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, CD_3OD): 8.04 (s, 1H, H-6), 7.95 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.5\text{ Hz}$, 2H, H-Bz), 7.72 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.6\text{ Hz}$, 1H, H-Bz), 7.55 (t, $^3J_{\text{HH}} = 6.7\text{ Hz}$, 2H, H-Bz), 5.29 - 5.23 (m, 1H, H-1'), 4.41 - 4.37 (m, 1H, H-3'), 4.36 - 4.32 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 9.7\text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 3.9\text{ Hz}$, 1H, H-2'), 3.78 - 3.73 (m, 1H, H-5'a), 3.71 - 3.67 (dd, $^2J_{\text{HH}} = 10.7\text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 4.3\text{ Hz}$, 1H, H-5'b), 2.20 - 2.10 (m, 2H, H-4', H-6'a), 1.92 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Thymin}$), 1.65 - 1.58 (m, 1H, H-6'b), 1.10 - 1.04 (m, 28H, H-TIPDS).

¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, CD₃OD): 144.1 (C-6), 136.2 (C-Bz), 131.5 (2xC-Bz), 130.3 (2xC-Bz), 74.0 (C-2'), 72.8 (C-3'), 62.0 (C-5'), 55.9 (C-1'), 43.5 (C-4'), 32.1 (C-6'), 18.0 (2xCH₃-TIPDS), 17.8 (2xCH₃-TIPDS), 17.7 (2xCH₃-TIPDS), 16.7 (2xCH₃-TIPDS), 14.8 (CH-TIPDS), 14.4 (CH-TIPDS), 14.0 (CH-TIPDS), 13.7 (CH-TIPDS), 12.4 (CH₃-Thymin).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3448, 2944, 2867, 1751, 1698, 1655, 1464, 1388, 1250, 1133, 1085, 1056, 885, 691, 594, 447, 415.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+H⁺]: 603.2844, gefunden: 603.2923.

Synthese von N3-Benzoyl-5'-fluor-L-carba-ribothymidin 125

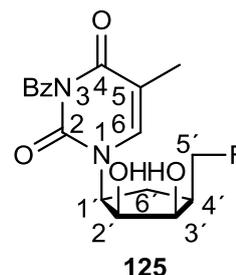
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 15 mg (27 μ mol, 1.0 Äquiv.) des Nucleosids **95** in 2 mL abs. Dichlormethan gelöst und bei -30 °C mit 3.9 μ L (29 μ mol, 1.1 Äquiv.) DAST versetzt. Die Reaktionsverfolgung erfolgte dünnschichtchromatographisch (PE/EE 1:3 v/v). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Silicagel beendet. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 1:2 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 7 mg (19 μ mol, 76%) eines verunreinigten Öls.

Summenformel: C₁₈H₁₉FN₂O₅

Molekulargewicht: 362.3523 g/mol

DC: R_f (PE/EE 1:2 v/v): 0.38



¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, CD₃OD): 7.96 - 7.92 (m, 3H, H-6, H-Bz), 7.73 - 7.68 (m, 1H, H-Bz), 7.57 - 7.52 (m, 2H, H-Bz), 5.14 - 5.08 (m, 1H, H-1'), 4.80 - 4.68 (m, 1H, H-5'a), 4.57 - 4.45 (m, 1H, H-5'b), 4.22 (dd, ³J_{HH} = 8.3 Hz, ³J_{HH} = 3.7 Hz, 1H, H-2'), 4.15 (t, ³J_{HH} = 4.1 Hz, 1H, H-3'), 2.35 - 2.28 (m, 1H, H-4'), 2.22 - 2.16 (m, 1H, H-6'a), 1.94 (s, 3H, CH₃-Thymin), 1.88 - 1.80 (m, 1H, H-6'b).

¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, CD₃OD): 143.3 (C-6), 136.2 (C-Bz), 131.5 (C_q-Bz), 130.3 (2xC-Bz), 84.0 (d, ²J_{CF} = 169.0 Hz, C-5'), 73.0 (C-2'), 72.3 (C-3'), 56.1 (C-1'), 41.3 (d, ²J_{CF} = 19.8 Hz, C-4'), 31.3 (C-6'), 12.5 (CH₃-Thymin).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2472; 2216; 2070; 1121; 972; 822; 472:

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+H⁺]: 663.1356, gefunden: 663.1351.

Synthese von 5'-Fluor-L-carba-ribo-“up”-thymidin 126

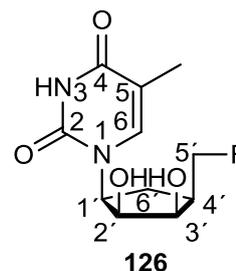
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 7 mg (19.3 µmol, 1.0 Äquiv.) von **125** in 2 mL einer 1%igen Lösung von Natriumhydroxid in Methanol bei Raumtemperatur gerührt. Nach 24 Stunden wurde die Reaktion mit 1 M Salzsäure neutralisiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Dichlormethan/MeOH 9:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 1 mg (3.9 µmol, 20%) eines verunreinigten Öls.

Summenformel: C₁₁H₁₅FN₂O₄

Molekulargewicht: 258.2462 g/mol

DC: R_f (DCM/MeOH 9:1, v/v): 0.35



¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, CD₃OD): 7.76 (s, 1H, H-6), 5.11 – 5.05 (m, 1H, H-1'), 4.78 - 4.65 (m, 1H, H-5'a), 4.55 - 4.42 (m, 1H, H-5'b), 4.22 (dd, ³J_{HH} = 8.2 Hz, ³J_{HH} = 4.1 Hz, 1H, H-2'), 4.15 (t, ³J_{HH} = 4.6 Hz, 1H, H-3'), 2.35 – 2.26 (m, 1H, H-4'), 2.22 -2.17 (m, 1H, H-6'a), 1.89 (s, 3H, CH₃-Thymin), 1.82 - 1.74 (m, 1H, H-6'b).

¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, CD₃OD): 141.6 (C-6), 82.7 (d, ²J_{CF} = 185.0 Hz, C-5'), 71.5 (C-2'), 70.4 (C-3'), 54.4 (C-1'), 39.9 (d, ²J_{CF} = 19.8 Hz, C-4'), 29.4 (C-6'), 11.1 (CH₃-Thymin).

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+H⁺]: 258.1016, gefunden: 259.1092.

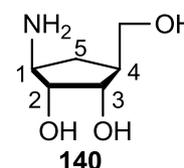
Synthese von (1R,2R,3S,4R)-4-Hydroxymethyl-1-aminocyclopentan-2,3-diol 140

Es wurden 904 mg (1.98 mmol, 1.0 Äquiv.) des Boc-Derivats **139** in Methanol gelöst und bei 0 °C mit 2 M HCl (8 mL) versetzt. Der Reaktionsfortschritt wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach 20 Stunden wurden weitere 8 mL 2 M HCl hinzugegeben. Nach weiteren 4 Stunden wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 2.49 g (16.9 mmol, quantitativ) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₆H₁₃NO₃

Molekulargewicht: 147.1723 g/mol



$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, D_2O): 3.91 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, 1H, *H*-2), 3.87 – 3.82 (m, 1H, *H*-3), 3.54 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.0$ Hz, 2H, O- CH_2), 3.51 – 3.42 (m, 1H, *H*-1), 2.27 (m, 1H, *H*-5a), 2.15 - 2.05 (m, 1H, *H*-4), 1.31 – 1.21 (dt, $^2J_{\text{HH}} = 10.0$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 8.9$ Hz, 1H, *H*-5b).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (101 MHz, MeOD): 74.5 (C-2), 71.9 (C-3), 62.6 (O- CH_2), 54.7(C-1), 44.6 (C-5), 27.1 (C-4).

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für $[\text{M}+\text{H}^+]$: 148.0895, gefunden: 148.0968.

Synthese von (1*R*,2*R*,3*S*,4*R*)-*O*-(tetraisopropyldisiloxyl)-aminodinitrophenol-cyclopentan-2-ol **96**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 140 mg (0.76 mmol, 1.0 Äquiv.) des Triols **140** in abs. DMF gelöst und mit 324 mg (3.06 mmol, 4.0 Äquiv.) Natriumcarbonat versetzt. Bei Raumtemperatur wurden dem Reaktionsgemisch langsam 95 μL (0.76 mmol, 1.0 Äquiv.) 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol zugegeben. Die Reaktion wurde durch Entfernung des Lösungsmittels beendet. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE/MeOH) gereinigt.

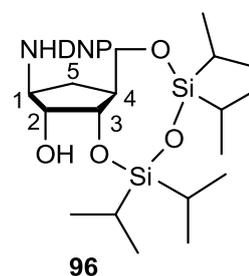
Im Anschluss wurden 155 mg (0.49 mmol, 1.0 Äquiv.) des isolierten Triols **141** unter Stickstoffatmosphäre in DMF gelöst und mit 0.16 mL (0.50 mmol, 1.0 Äquiv.) TIPDS-chlorid und 104 mg (1.5 mmol, 3.0 Äquiv.) Imidazol versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bis zur vollständigen Umsetzung bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser beendet. Das Reaktionsgemisch wurde dann dreimal mit Ethylacetat, einmal mit gesättigter Natriumchloridlösung und einmal mit Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Toluol/Aceton 9:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 200 mg (0.4 mmol, 52%) eines gelblichen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_8\text{Si}_2$

Molekulargewicht: 555.7686 g/mol

DC: R_f (Toluol/Aceton 9:1 v/v): 0.33



$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (600 MHz, CDCl_3): 9.15 (s, 1H, *H*-3_{arom}), 8.44 (d, $^3J_{\text{HH}} = 5.8$ Hz, 1H, *NH*), 8.33 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9.6$ Hz, 1H, *H*-5_{arom}), 7.28 (s, 1H, *H*-6_{arom}), 4.16 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 9.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, 1H, *H*-2), 4.00 (dd, $^2J_{\text{HH}} = 11.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.3$ Hz, 1H, O- CH_2 a), 3.92 -3.87 (m, 1H, *H*-3), 3.86 - 3.81 (m, 2H, O- CH_2 b/*H*-4), 2.39 – 2.33 (m, 1H, *H*-5a), 2.29 – 2.21 (m, 1H, *H*-1), 1.59 – 1.51 (m, 1H, *H*-5b), 1.12 – 0.98 (m, 28H, *H*-TIPDS).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (151 MHz, CDCl_3): 130.7 (C-3_{arom}), 124.2 (C-5_{arom}), 115.7 (C-6_{arom}), 76.5 (C-4), 72.5 (C-2), 60.2 (O-CH_2), 58.6 (C-3), 44.1 (C-1), 30.7 (C-5), 17.6 ($\text{CH}_3\text{-TIPDS}$), 17.5 (3x $\text{CH}_3\text{-TIPDS}$), 17.4 ($\text{CH}_3\text{-TIPDS}$), 17.3 ($\text{CH}_3\text{-TIPDS}$), 17.3 ($\text{CH}_3\text{-TIPDS}$), 17.2 ($\text{CH}_3\text{-TIPDS}$), 13.6 (CH-TIPDS), 13.4 (CH-TIPDS), 12.9 (CH-TIPDS), 12.9 (CH-TIPDS).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3534, 3365, 2944, 2867, 1718, 1590, 1522, 1464, 1431, 1335, 1305, 1283, 1245, 1117, 1105, 1079, 1049, 1033, 992, 884, 857, 695, 5998, 464.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für $[\text{M}+\text{H}^+]$: 556.2510, gefunden: 556.2512.

Synthese von (1*R*,2*S*,3*S*,4*R*)-2-Fluoro-*O*-(tetra*i*sopropyldisiloxy)-aminodinitrophenylcyclopentan 142

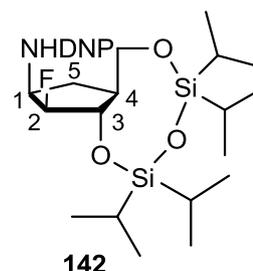
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 6 mL DCM auf 0 °C gekühlt und danach 29 μL (0.22 mmol, 1.2 Äquiv.) einer konzentrierten DAST-Lösung hinzugegeben. In einem zweiten Reaktionskolben wurden 101 mg (0.18 mmol, 1.0 Äquiv.) des Alkohols **96** in 12 mL Dichlormethan gelöst und auf -78 °C gekühlt. Die DAST-Lösung wurde nun langsam über 20 Minuten zu dem Alkohol hinzugegeben. Nach Zugabe wurde das Reaktionsgemisch 25 Minuten ohne Kühlung gerührt, wobei der Reaktionsfortschritt dünnschichtchromatographisch verfolgt wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Eiswasser bei -78 °C beendet. Das Reaktionsgemisch wurde dann dreimal mit Dichlormethan extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 4:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 63 mg (0.1 mmol, 62%) eines gelblichen Feststoffs.

Summenformel: $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{FN}_3\text{O}_7\text{Si}_2$

Molekulargewicht: 557.7597 g/mol

DC: R_f (PE/EE 4:1, v/v): 0.64



$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO): 8.88 (d, $^4J_{\text{HH}} = 2.7$ Hz, 1H, $H\text{-3}_{\text{arom}}$), 8.58 (d, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 1H, NH), 8.31 (dd, $^2J_{\text{HH}} = 9.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 2.7$ Hz, 1H, $H\text{-5}_{\text{arom}}$), 7.36 (d, $^2J_{\text{HH}} = 9.6$ Hz, 1H, $H\text{-6}_{\text{arom}}$), 5.15 (dt, $^2J_{\text{HF}} = 53.9$ Hz, 1H, $H\text{-2}$), 4.46 (dt, $^2J_{\text{HH}} = 14.9$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 1H, $H\text{-1}$), 4.26 (dm, $^3J_{\text{HF}} = 25.5$ Hz, 1H, $H\text{-3}$), 3.91 (dd, $^2J_{\text{HH}} = 11.8$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 3.4$ Hz, 1H, $\text{O-CH}_2\text{a}$), 3.80 – 3.72 (m, 1H, $\text{O-CH}_2\text{b}$), 2.40 – 2.32 (m, 1H, $H\text{-4}$), 2.05 – 1.95 (m, 1H, $H\text{-5a}$), 1.60 – 1.48 (m, 1H, $H\text{-5b}$), 1.10 – 1.00 (m, 28H, $H\text{-TIPDS}$).

¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, DMSO): 130.2 (C-3_{arom}), 123.4 (C-5_{arom}), 116.1 (C-6_{arom}), 76.7 (C-4), 76.4 (C-2), 61.2 (O-CH₂), 50.2 (C-3), 42.6 (C-1), 30.1 (C-5), 17.3 (CH₃-TIPDS), 17.1 (3xCH₃-TIPDS), 16.9 (2xCH₃-TIPDS), 16.8 (2xCH₃-TIPDS), 17.2 (CH₃-TIPDS), 12.8 (CH-TIPDS), 12.7 (CH-TIPDS), 12.1 (CH-TIPDS), 12.0 (CH-TIPDS).

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (471 MHz, DMSO): -195.1

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3357, 2945, 2867, 1619, 1591, 1523, 1464, 1431, 1336, 1284, 1248, 1136, 1105, 1061, 1031, 923, 884, 834, 695.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+H⁺]: 558.2467, gefunden: 558.2352.

Synthese von (-)-(1S,4R)-tert-Butyl-3-oxo-2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-carboxylat **130**

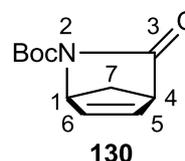
Unter Stickstoffatmosphäre wurden bei Raumtemperatur zu einer Suspension aus 2.50 g (22.9 mmol, 1.0 Äquiv.) (+)-Vince-Lactam **129** und 28 mg (0.23 mmol, 0.01 Äquiv.) DMAP in 40 mL THF langsam 5.3 mL (24.7 mmol, 1.1 Äquiv.) Di-tert-butylcarbonat hinzugetropft. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt und das Lösungsmittel nach vollständiger Umsetzung im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 1:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 4.54 g (21.7 mmol, 94%) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₁₁H₁₅NO₃

Molekulargewicht: 209.2417 g/mol

DC: R_f (PE/EE 1:1 v/v): 0.71



¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃): 6.89 (dd, ³J_{HH} = 5.3 Hz, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, 1H, H-5), 6.68 – 6.63 (m, 1H, H-6), 4.95 (d, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, 1H, H-1), 3.42 – 3.35 (m, 1H, H-4), 2.34 (d, ³J_{HH} = 8.8 Hz, 1H, H-7a), 2.14 (d, ³J_{HH} = 8.2 Hz, 1H, H-7b), 1.50 (s, 9H).

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, CDCl₃): 140.2 (C-5), 138.4 (C-6), 82.8 (C-Boc), 62.6 (C-1), 55.1 (C-7), 54.6 (C-4), 28.2 (C-Boc).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2976, 2929, 2025, 1973, 1757, 1703, 1369, 1327, 1307, 1258, 1151, 1117, 991, 855, 758, 739.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 232.0950, gefunden: 232.0945.

Synthese von (+)-(1S,4R,5S,6R)-tert-Butyl-5,6-dihydroxy-3-oxo-2-azabicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylat **138**

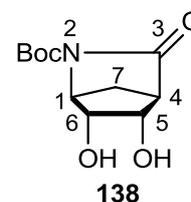
Es wurden 4.49 g (21.1 mmol, 1.0 Äquiv.) des derivatisierten (+)-Vince-Lactams **130** in 18 mL Aceton gelöst und anschließend mit 5.02 g (37.1 mmol, 1.75 Äquivalente) *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid Monohydrat **131** versetzt. Bei 0 °C erfolgte die Zugabe von 245 µL (46.2 µmol, cat.) einer 0.16 M OsO₄-Lösung sowie von 224 µL (2.36 mmol, 0.1 Äquiv.) *tert*-Butanol. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt und nach Zugabe von 5 mL einer gesättigten Natriumhydrogensulfidlösung beendet. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 1:2 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 3.91 g (16.1 mmol, 75%) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₁₁H₁₇NO₅

Molekulargewicht: 243.2564 g/mol

DC: R_f (PE/EE 1:1, v/v): 0.33



¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, CDCl₃): 4.34 (s, 1H, *H*-1), 4.24 (d, ³J_{HH} = 5.8 Hz, 1H, *H*-6), 4.12 -4.06 (m, 1H, *H*-5), 3.65 (bs, 2H, OH), 2.78 - 2.81 (d, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, 1H, *H*-4), 2.12- 2.06 (m, 1H, *H*-7a), 1.97 (dt, ²J_{HH} = 11.1 Hz, ⁴J_{HH} = 1.6 Hz, 1H, *H*-7b) 1.51 (s, 9H, *H*-Boc).

¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, CDCl₃): 173.5 (C-3), 149.5 (C_q-Boc), 84.2 (C-Boc), 70.9 (C-5), 68.5 (C-6), 62.6 (C-1), 54.1 (C-4), 32.3 (C-7), 28.5 (C-Boc).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3429, 2979, 2933, 1778, 1715, 1458, 1394, 1349, 1323, 1298, 1257, 1146, 1085, 1043, 1032, 1017, 949, 903, 839, 777, 756, 735, 718.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 266.1004, gefunden: 266.1000.

Synthese von (+)-(1S,2R,3S,5S)-3-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)-5-hydroxymethylcyclopenta-1,2-diol **139**

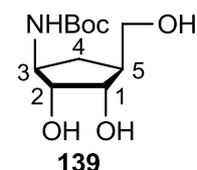
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 3.86 g (15.9 mmol, 1.0 Äquiv.) des Diols **138** in 30 mL abs. Methanol gelöst und bei 0 °C portionsweise mit 1.32 g (34.2 mmol, 2.2 Äquiv.) Natriumborhydrid versetzt. Die Lösung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach 2 Stunden wurde die Reaktion durch die Zugabe einer 2 M Salzsäurelösung beendet. Alle flüchtigen Bestandteile des Reaktionsgemisches wurden im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 1:6 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 2.78 g (11.2 mmol, 71%) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₁₁H₂₁NO₅

Molekulargewicht: 247.2881 g/mol

DC: R_f (PE/EE 1:6 v/v): 0.11



¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, MeOD): 3.84 – 3.76 (m, 2H, *H*-1/*H*-3), 3.71 – 3.65 (m, 1H, *H*-2), 3.55 (t, ³J_{HH} = 5.8 Hz, 2H, *H*-4), 2.22 (dt, ²J_{HH} = 13.2 Hz, ³J_{HH} = 8.5 Hz, 1H, O-CH₂a), 2.09 – 1.99 (m, 1H, *H*-5), 1.44 (s, 9H, *H*-Boc), 1.13 (dt, ²J_{HH} = 13.2 Hz, ³J_{HH} = 8.4 Hz, 1H, O-CH₂b).

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, MeOD): 78.2 (*C*-2), 74.1(*C*-1/*C*-3), 64.6 (O-CH₂), 56.7 (*C*-1/*C*-3), 46.3 (*C*-5), 31.3 (*C*-4), 28.8 (*C*-Boc).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3369, 2976, 2932, 2470, 1677, 1476, 1420, 1366, 1254, 1165, 1115, 1045, 996, 780, 576, 526, 459.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 270.1317, gefunden: 270.1313.

Synthese von (+)-(1*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-*tert*-Butyl-5,6-dibenzoat-3-oxo-2-azabicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylat **149**

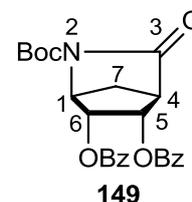
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 3.07 g (12.6 mmol, 1.0 Äquiv.) des Diols **138** in abs. Pyridin und abs. Acetonitril (1:1 v/v) gelöst. Bei 0 °C wurden anschließend 3.78 mL (32.8 mmol, 2.6 Äquiv.) Benzoylchlorid hinzugegeben. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Wasser beendet, das Reaktionsgemisch mit DCM extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch (PE/EE 2:1 v/v).

Ausbeute: 4.90 g (10.8 mmol, 86%) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₂₅H₂₅NO₇

Molekulargewicht: 451.4685 g/mol

DC: R_f (PE/EE 2:1 v/v): 0.76



¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO): 7.85 (dd, ³J_{HH}= 8.3 Hz, ⁴J_{HH}= 1.2 Hz, 2H, *H*-Bz), 7.81 (dd, ³J_{HH}= 8.3 Hz, ⁴J_{HH}= 1.2 Hz, 2H, *H*-Bz), 7.64 – 7.56 (m, 2H, *H*-Bz), 7.41 -7.31 (m, 4H, *H*-OBz), 5.54 (dd, ³J_{HH}= 6.0 Hz, ⁴J_{HH}= 1.0 Hz, 1H, *H*-6), 5.51 – 5.47 (m, 1H, *H*-5), 4.62 (s, 1H, *H*-1), 3.05 (d, ⁴J_{HH}= 1.5 Hz, 1H, *H*-4), 2.41 - 2.27 (m, 2H, *H*-7), 1.49 (s, 9H, *H*-Boc).

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, DMSO): 170.0 (C-3), 164.5 (2xC_q-Bz), 148.2 (C_q-Boc), 133.9 (2xC-Bz), 129.2 (2xC-Bz), 129.2 (2xC-Bz), 128.6 (2xC-Bz), 128.5 (2xC-Bz), 82.4 (C-Boc), 71.9 (C-5), 70.2 (C-6), 60.2 (C-1), 51.0 (C-4), 33.4 (C-7), 27.6 (C-Boc).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2980, 1795, 1770, 1724, 1602, 1452, 1368, 1137, 1314, 1296, 1274, 1218, 1152, 1115, 1071, 1026, 963, 775, 709.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 474.1529, gefunden: 474.1537.

Synthese von (+)-(1*S*,2*R*,3*S*,5*S*)-3-((*tert*-Butoxycarbonyl)amino)-5-(hydroxymethyl)-cyclopentane-1,2-dibenzoat **150**

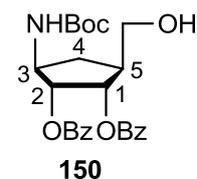
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 4.85 g (10.7 mmol, 1.0 Äquiv.) des Benzoats **149** in 50 mL Methanol gelöst und bei 0 °C portionsweise mit 895 mg (23.6 mmol, 2.2 Äquiv.) Natriumborhydrid versetzt. Die Lösung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und dünnschichtchromatographisch verfolgt. Durch Zugabe von 1 N Salzsäure wurde die Reaktion beendet. Das Reaktionsgemisch wurde unter reduziertem Druck konzentriert. Die zurückgebliebene wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 2:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 4.49 g (9.86 mmol, 92%) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₂₅H₂₉NO₇

Molekulargewicht: 455.5003

DC: R_f (PE/EE 1:1, v/v): 0.38



¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, DMSO): 7.84 (dd, ³J_{HH}= 8.4 Hz, ⁴J_{HH}= 1.2 Hz, 2H, *H*-Bz), 7.80 (d, ³J_{HH}= 8.3 Hz, ⁴J_{HH}= 1.3 Hz, 2H, *H*-Bz), 7.62 (dt, ²J_{HH}= 21.0 Hz, ³J_{HH}= 7.4 Hz, ⁴J_{HH}= 1.3 Hz, 2H, *H*-Bz), 7.46 (dt, ³J_{HH}= 7.7 Hz, 1H, *H*-Bz), 7.40 (t, ³J_{HH}= 7.7 Hz, 2H, *H*-Bz), 7.15 (d, ³J_{HH}= 8.5 Hz, 1H, *NH*), 5.42 - 5.37 (m, 1H, *H*-1), 5.18 (dd, ³J_{HH}= 8.1 Hz, ³J_{HH}= 5.7 Hz, 1H, *H*-2), 4.89 (t, ³J_{HH}= 4.9 Hz, 1H, *OH*), 4.31 - 4.22 (m, 1H, *H*-3), 3.55 (dt, ²J_{HH}= 10.6 Hz, ³J_{HH}= 5.2 Hz, 1H, O-CH₂a), 3.46 (dt, ²J_{HH}= 10.2 Hz, ³J_{HH}= 5.5 Hz, 1H, O-CH₂b), 2.40 - 2.31 (m, 1H, *H*-5), 2.22 (dt, ²J_{HH}= 13.4 Hz, ³J_{HH}= 8.6 Hz, 1H, *H*-4a), 1.45 – 1.38 (m, 1H, *H*-4b), 1.32 (s, 9H, *H*-Boc).

¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, DMSO): 164.9 (C_q-Bz), 133.4 (2xC-Bz), 129.0 (4xC-Bz), 128.7 (2xC-Bz), 128.5 (2xC-Bz), 77.9 (C-2), 76.8 (C-Boc), 73.5 (C-1), 61.7 (O-CH₂), 52.9 (C-3), 43.0 (C-5), 28.5 (C-4), 28.1 (CH₃-Boc).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3372, 2976, 1713, 1602, 1523, 1452, 1391, 1366, 1315, 1281, 1168, 1122, 1070, 1027, 708.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 478.1842 gefunden: 478.1866.

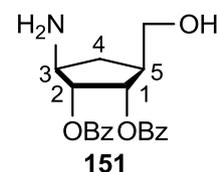
Synthese von (+)-(1S,2R,3S,5S)-3-Amino-5-(hydroxymethyl)cyclopentane-1,2-dibenzoat **151**

Es wurden 904 mg (1.98 mmol, 1.0 Äquiv.) des Boc-Derivats **150** in Methanol gelöst und mit 2 M HCl versetzt. Der Reaktionsfortschritt wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach vollständigem Umsatz wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 778 mg (1.98 mmol, quantitativ) eines farblosen Feststoffs.

Summenformel: C₂₀H₂₁NO₅

Molekulargewicht: 355.3844 g/mol



¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, DMSO): 8.62 (s, 3H, NH), 7.85 (d, ³J_{HH} = 7.5 Hz, 4H, H-Bz), 7.61 (q, ³J_{HH} = 8.1 Hz, ³J_{HH} = 7.5 Hz, 2H, H-Bz), 7.43 (dt, ²J_{HH} = 19.9 Hz, ³J_{HH} = 7.8 Hz, 4H, H-Bz), 5.48 (d, ³J_{HH} = 5.0 Hz, 2H, H-2, H-1), 5.06 (s, 1H, OH), 3.96–3.88 (m, 1H, H-5), 3.58 (dd, ²J_{HH} = 11.0 Hz, ³J_{HH} = 5.1 Hz, 1H, O-CH₂a), 3.51 (dd, ²J_{HH} = 10.8 Hz, ³J_{HH} = 5.1 Hz, 1H, O-CH₂b), 2.47 – 2.42 (m, 1H, H-3), 2.42–2.35 (m, 1H, H-4a), 1.70 - 1.62 (m, 1H, H-4b).

¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, DMSO): 164.8 (2xC_q-Bz), 133.5 (2xC-Bz), 129.3 (2xC-Bz), 129.2 (2xC-Bz), 128.7 (2xC-Bz), 128.5 (2xC-Bz), 74.7 (C-1/C-2), 73.1 (C-1/C-2), 61.0 (O-CH₂), 52.7 (C-5), 43.3 (C-3), 27.3 (C-4).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3546, 3352, 2927, 2877, 1711, 1601, 1584, 1501, 1451, 1317, 1259, 1180, 1109, 1058, 1027, 888, 872, 856, 711, 702, 684, 671.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 356.1498, gefunden: 356.1502.

Synthese von (-)-(1*S*,2*R*,5*S*)-5-(Hydroxymethyl)cyclopent-3-en-1,2-dibenzoat 152

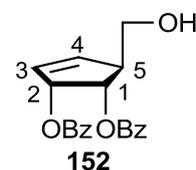
Es wurden 1.54 g (3.90 mmol, 1.0 Äquiv.) (+)-(1*S*,2*R*,3*S*,5*S*)-3-Amino-5-(hydroxymethyl)cyclopentan-1,2-dibenzoat **151** in Acetonitril und Wasser (je 15 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Unter starkem Rühren wurden portionsweise 595 mg (8.60 mmol, 2.2 Äquiv.) Natriumnitrit hinzugefügt. Nach 15-minütigem Rühren erfolgte bei 0 °C die tropfenweise Zugabe von 15 mL 50%iger Essigsäure (über 30 Minuten). Das Reaktionsgemisch wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Wasser versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und anschließend säulenchromatographisch (PE/EE 2:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 457 mg (1.30 mmol, 34 %) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₂₀H₁₈NO₅

Molekulargewicht: 338.3539 g/mol

DC: R_f (PE/EE 2:1, v/v): 0.36



¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, CDCl₃): 7.99 (dd, ³J_{HH} = 8.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.1 Hz, 2H, *H*-Bz), 7.90 (dd, ³J_{HH} = 8.2 Hz, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, 2H, *H*-Bz), 7.53 (dt, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ⁴J_{HH} = 1.4 Hz, 2H, *H*-Bz), 7.48 (dt, ³J_{HH} = 8.5 Hz, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, 2H, *H*-Bz), 7.39- 7.35 (m, 1H, *H*-Bz), 7.31- 7.26 (m, 1H, *H*-Bz), 6.12 -6.05 (m, 3H, *H*-2, *H*-3, *H*-4), 5.55 (dd, ³J_{HH} = 6.1 Hz, ³J_{HH} = 4.8 Hz, 1H, *H*-1) 3.87 (dd, ²J_{HH} = 11.5 Hz, ³J_{HH} = 5.1 Hz, 1H, O-CH₂a), 3.82 (dd, ²J_{HH} = 11.1 Hz, ³J_{HH} = 6.0 Hz, 1H, O-CH₂b), 3.29 – 3.25 (m, 1H, *H*-5).

¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, CDCl₃): 166.8 (C_q-Bz), 166.1 (C_q-Bz), 137.2 (C-3/C-4), 133.4 (2xC-Bz), 133.2 (2xC-Bz), 129.9 (2xC-Bz), 129.8 (2xC-Bz), 129.7 (C-3/C-4), 128.4 (2xC-Bz), 76.9 (C-2), 74.3 (C-1), 63.2 (O-CH₂), 52.3 (C-5).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3497, 3428, 1720, 1452, 1316, 1281, 1177, 1122, 1070, 1027, 710, 688.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 361.1052, gefunden: 361.1003.

Synthese von (-)-(1*S*,2*R*,5*S*)-5-(Hydroxymethyl)cyclopent-3-en-1,2-diol **160**

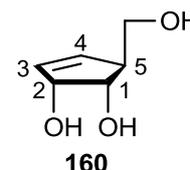
Es wurden 876 mg (2.59 mmol, 1.0 Äquiv.) des Alkohols **152** in 15 mL einer 1%igen methanolischen Natronlauge gelöst. Der Reaktionsfortschritt wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach vollständiger Umsetzung wurde die Reaktionslösung durch die Zugabe von 1 M HCl neutralisiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und säulenchromatographisch an Kieselgel (EE/MeOH 9:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 250 mg (2.15 mmol, 84%) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₆H₁₀O₃

Molekulargewicht: 130.1418 g/mol

DC: R_f (EE/MeOH 9:1 v/v): 0.23



¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, MeOD): 5.93 (dd, ³J_{HH} = 6.2 Hz, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, 1H, H-4), 5.84 (dt, ³J_{HH} = 6.1 Hz, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, 1H, H-3), 4.49 – 4.45 (m, 1H, H-2), 3.92 – 3.88 (m, 1H, H-1), 3.70 (dd, ²J_{HH} = 10.8 Hz, ³J_{HH} = 5.3 Hz, 1H, O-CH₂a), 3.52 (dd, ²J_{HH} = 10.8 Hz, ³J_{HH} = 6.6 Hz, 1H, O-CH₂b), 2.78 – 2.71 (m, 1H, H-5).

¹³C-NMR: δ [ppm] (101 MHz, MeOD): 136.4 (C-4), 133.5 (C-3), 76.0 (C-2), 74.6 (C-1), 63.7 (O-CH₂), 55.2 (C-5).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3314, 2920, 1403, 1326, 1078, 1042, 744, 593, 543.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 153.0528, gefunden: 153.0515.

Synthese von (1*S*,2*R*,5*S*)-1,2-Di(benzyloxy)-5-(benzyloxymethyl)-cyclopent-3-en **161****Ausgehend der Syntheseroute A:**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 64.8 mg (2.70 mmol, 3.6 Äquiv.) Natriumhydrid in 70 mL THF suspendiert. Zu der Suspension wurde bei 0 °C eine Lösung aus 87 mg (0.749 mmol, 1.0 Äquiv.) des Triols **160**, gelöst in abs. THF, hinzugegeben. Nach einer Stunde des Rührens wurden bei Raumtemperatur langsam 345 µL (2.90 mmol, 3.9 Äquiv.) Benzylbromid zum Reaktionsgemisch hinzugegeben. Die Reaktion wurde nach 24 Stunden durch die Zugabe von Eis beendet, mit Ethylacetat extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 9:1 v/v) gereinigt.

Ausgehend von der Syntheseroute B/C:**Variante 1:**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 1.25 g (2.52 mmol, 1.0 Äquiv.) der benzylgeschützten Verbindung **165** in 20 mL abs. DMF gelöst und mit 565 mg (5.04 mmol, 2.0 Äquiv.) Kalium-*tert*-butylat versetzt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Durch die Zugabe von Wasser wurde die Reaktion beendet und anschließend mit 1 M HCl neutralisiert. Das Reaktionsgemisch wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wurde eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (PE/EE 9:1 v/v) durchgeführt.

Variante 2:

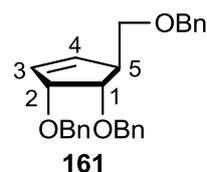
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 40 mg (1.7 mmol, 5.7 Äquiv.) Natriumhydrid in 1.5 mL abs. DMF suspendiert und 158 mg (31.8 μ mol, 1.0 Äquiv.) des Edukts **165** sowie 65 μ L (1.61 mmol, 5.4 Äquiv.) abs. Methanol hinzugefügt. Nach 30 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von Eiswasser beendet und mit 1 M HCl neutralisiert. Das Reaktionsgemisch wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigte organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es wurde eine säulenchromatographische Reinigung an Kieselgel (PE/Aceton 9:1 v/v) durchgeführt.

Ausbeute: 922 mg (2.28 mmol, 91%) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₂₇H₂₈O₃

Molekulargewicht: 400.5094 g/mol

DC: R_f (PE/Aceton 9:1 v/v): 0.40



¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, CDCl₃): 7.39 – 7.27 (m, 15H, *H*-Bn), 6.03 (dd, ³J_{HH} = 6.4 Hz, ⁴J_{HH} = 1.8 Hz, 1H, *H*-4), 5.93 (dt, ³J_{HH} = 6.1 Hz, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, 1H, *H*-3), 4.74 (d, ²J_{HH} = 11.7 Hz, 1H, *H*-1), 4.61 (s, 2H, CH₂-Bn), 4.57 - 4.47 (m, 4H, CH₂-Bn), 3.89 (t, ³J_{HH} = 5.7 Hz, 1H, *H*-3), 3.58 (dd, ³J_{HH} = 8.7 Hz, ³J_{HH} = 5.0 Hz, 1H, O-CH₂a), 3.45 (dd, ²J_{HH} = 9.2 Hz, ³J_{HH} = 5.8 Hz, 1H, O-CH₂b), 3.21 - 3.13 (m, 1H, *H*-5).

¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, CDCl₃): 139.1 (C_q-Bn), 138.6 (C_q-Bn), 138.5 (C_q-Bn), 136.8 (C-4), 130.2 (C-3), 128.5 (C-Bn), 128.4 (C-Bn), 128.2 (C-Bn), 127.8 (C-Bn), 127.7 (C-Bn), 127.6 (C-Bn), 80.3 (C-2), 80.0 (O-CH₂), 73.5 (O-CH₂), 72.4 (O-CH₂), 70.8 (C-6), 50.7 (C-5).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3062, 3030, 2859, 1496, 14554, 1359, 1207, 1126, 1092, 1071, 1028, 736, 697.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 423.1936, gefunden: 423.1944.

Synthese von (1S,2S,3S,4R)-2-(Benzyloxymethyl)-3,4-dihydroxycyclopentenylnmethansulfonat 163

Verwendung von AD-Mix β :

Es wurden 2.80 g (9.92 mmol, 1.0 Äquiv.) des Edukts **162** in einem Gemisch aus *tert*-Butanol und Wasser (2:1) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden 943 mg (9.91 mmol, 1.0 Äquiv.) Methansulfonamid und 13.9 g (1.4 Äquiv./mmol Edukt) AD-Mix β hinzugefügt und anschließend langsam auf RT erwärmt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt und durch Zugabe von 35 mL gesättigter Dinatriumdisulfidlösung beendet. Das Reaktionsgemisch wurde mit Ethylacetat extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Anschließend erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 1:2 v/v), gefolgt von einer weiteren säulenchromatographischen Reinigung (PE/Aceton 1:2 v/v).

Verwendung von AD-Mix α :

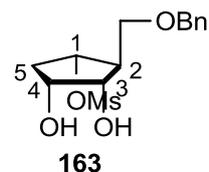
Es wurden 154 mg (0.55 mmol, 1.0 Äquiv.) des Edukts **162** in einem Gemisch aus *tert*-Butanol und Wasser (2:1 v/v) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu der Lösung wurden 55 mg (0.58 mmol, 1.05 Äquivalente) Methansulfonamid und 788 mg (1.4 Äq./mmol Edukt) AD-Mix α hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wurde anschließend langsam auf RT erwärmt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt und durch Zugabe von 2 mL gesättigter Dinatriumdisulfidlösung beendet. Das Reaktionsgemisch wurde mit Ethylacetat extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Anschließend erfolgte eine säulenchromatographische Reinigung (PE/EE 1:2 v/v), gefolgt von einer weiteren säulenchromatographischen Reinigung (PE/Aceton 1:2 v/v).

Ausbeute: 2.02 g (6.38 mmol, 64%) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₁₄H₂₀O₆S

Molekulargewicht: 316.3700 g/mol

DC: R_f (PE/EE 1:2 v/v): 0.28



¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, CDCl₃): 7.41 – 7.28 (m, 5H, *H*-Bn), 4.88 (s, 1H, *H*-1), 4.60 – 4.50 (m, 2H, CH₂-Bn), 4.14 – 4.08 (m, 1H, *H*-3), 3.88 (dd, ³J_{HH} = 7.5 Hz, ³J_{HH} = 4.3 Hz, 1H, *H*-4), 3.75 (dd, ³J_{HH} = 8.6 Hz, ³J_{HH} = 4.4 Hz, 1H, O-CH₂a), 3.70–3.65 (m, 1H, O-CH₂b), 2.95 (s, 3H, CH₃-Ms), 2.56 – 2.50 (m, 1H, *H*-2), 2.41–2.29 (m, 3H, *H*-5a, 2xOH), 2.11 (d, ²J_{HH} = 15.3 Hz, 1H, *H*-5b).

¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, CDCl₃): 137.8 (C_q-Bn), 128.7 (2xC-Bn), 128.1 (C-Bn), 128.0 (2xC-Bn), 80.0 (C-1), 75.1 (C-3), 73.7 (O-CH₂), 71.6 (C-4), 68.9 (O-CH₂), 50.5 (C-2), 38.4 (C-5), 38.4 (CH₃-Ms).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3503, 3470, 3400, 3359, 3295, 3232, 2869, 1348, 1206, 1175, 1127, 1101, 965, 943, 750, 700, 557, 537.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 339.0878, gefunden: 339.0875.

Synthese von (1S,2S,3S,4R)-2-(benzyloxymethyl)-3,4-Di(benzyloxy)-cyclopentenyl-methansulfonat **165**

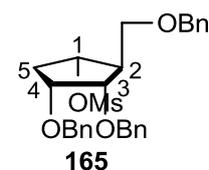
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 1.72 g (5.45 mmol, 1:0 Äquiv.) des Diols **163** in abs. DMF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von 327 mg (13.6 mmol, 2.5 Äquiv.) Natriumhydrid wurde das Reaktionsgemisch für 5 min gerührt. Es erfolgte die Zugabe von 1.7 mL (14.1 mmol, 2.6 Äquiv.) Benzylbromid und das Reaktionsgemisch wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Der Reaktionsfortschritt wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt und die Reaktion durch die Zugabe von Eis beendet. Nach der Extraktion mit Ethylacetat wurde die organische Phase mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/Aceton 3:1) gereinigt.

Ausbeute: 2.15 g (4.34 mmol, 80%) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₂₈H₃₂O₆S

Molekulargewicht: 496.6151 g/mol

DC: R_f (PE/Aceton 3:1 v/v): 0.55



¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, CDCl₃): 7.39 – 7.25 (m, 15H, *H*-Bn), 4.88 - 4.83 (m, 1H, *H*-1), 4.58 (dd, ²*J*_{HH}= 11.9 Hz, ³*J*_{HH}= 3.0 Hz, 2H, CH₂-Bn), 4.53 – 4.44 (m, 4H, 2xCH₂-Bn), 3.97 (dd, ³*J*_{HH}= 8.0 Hz, ³*J*_{HH}= 3.9 Hz, *H*-3), 3.69 (dd, ³*J*_{HH}= 8.8 Hz, ³*J*_{HH}= 4.3 Hz, 1H, *H*-4), 3.61 (dd, ²*J*_{HH}= 9.8 Hz, ³*J*_{HH}= 4.5 Hz, 1H, O-CH₂a), 3.54 (dd, ²*J*_{HH}= 9.8 Hz, ³*J*_{HH}= 4.7 Hz, 1H, O-CH₂b), 3.11 (s, 3H, CH₃-Ms), 2.24 (ddd, ²*J*_{HH}= 12.7 Hz, ³*J*_{HH}= 7.9 Hz, ³*J*_{HH}= 5.4 Hz, 1H, *H*-5a), 2.53 – 2.46* (m, 1H, *H*-2), 2.10 (dt, ²*J*_{HH}= 14.2 Hz, ³*J*_{HH}= 3.4 Hz, 1H, *H*-5b).

*aus dem HSQC bestimmt.

¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, CDCl₃): 138.7 (C_q-Bn), 138.4 (C_q-Bn), 138.2 (C_q-Bn), 128.2 (2xC-Bn), 128.2 (4xC-Bn), 127.6 (2xC-Bn), 127.6 (2xC-Bn), 127.5 (2xC-Bn), 127.5 (2xC-Bn), 127.4 (C-Bn), 79.8 (C-1), 78.9 (C-4), 75.8 (C-3), 72.3 (CH₂-Bn), 70.7 (CH₂-Bn), 70.1 (CH₂-Bn), 67.1 (O-CH₂), 49.1 (C-2), 37.5 (CH₃-Ms), 35.1 (C-5).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3087, 3063, 3030, 2935, 2863, 1496, 1454, 1354, 1174, 1096, 1045, 1027, 942, 862, 738, 698, 531, 523.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 519.1817, gefunden: 519.1828.

Synthese von (1*S*,2*R*,3*S*,4*S*)-2,3-Benzylloxymethyl-4-(Benzylloxymethyl)-cyclopentanol **92**

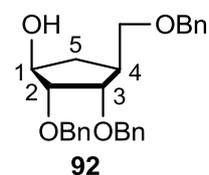
Unter Stickstoffatmosphäre wurden 2.50 g (6.24 mmol, 1:0 Äquiv.) des Cyclopentens **161** in 2 mL abs. THF gelöst und bei 0 °C langsam mit 25.0 mL (12.5 mmol, 2.0 Äquiv.) einer 0.5 M 9-BBN-Lösung versetzt. Nach 24 Stunden des Rührens bei Raumtemperatur wurden bei 0 °C langsam 4.4 mL einer 3 M Natriumhydroxidlösung in Methanol und 4.4 mL einer 30%igen Wasserstoffperoxidlösung hinzugegeben. Nach 5 Stunden wurde das Reaktionsgemisch filtriert und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohgemisch wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (PE/Aceton, 9:1 v/v).

Ausbeute: 2.37 g (5.67 mmol, 91%) eines farblosen Harzes.

Summenformel: C₂₇H₃₀O₄

Molekulargewicht: 418.5247 g/mol

DC: R_f (PE/Aceton 9:1 v/v): 0.42



¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, CDCl₃): 7.40 – 7.25 (m, 15H, *H*-Bn), 4.65 – 4.44 (m, 6H, CH₂-Bn), 4.25 – 4.21 (m, 1H, *H*-1), 3.97 (t, ³*J*_{HH} = 4.0 Hz, 1H, *H*-3), 3.72 (t, ³*J*_{HH} = 4.1 Hz, 1H, *H*-2), 3.51 (dd, ³*J*_{HH} = 9.0 Hz, ³*J*_{HH} = 3.1 Hz, 1H, O-CH₂a), 3.43 (dd, ³*J*_{HH} = 9.0 Hz, ³*J*_{HH} = 4.0 Hz, 1H, O-CH₂b), 2.47 – 2.36 (m, 2H, *H*-4, *H*-5a), 1.43 – 1.35 (m, 1H, *H*-5b).

¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, CDCl₃): 138.6 (C_q-Bn), 138.6 (C_q-Bn), 138.0 (C_q-Bn), 128.6 (2xC-Bn), 128.5 (2xC-Bn), 128.4 (2xC-Bn), 128.1 (2xC-Bn), 128.1 (2xC-Bn), 127.9 (C-Bn), 127.9 (2xC-Bn), 127.8 (C-Bn), 127.7 (C-Bn), 83.6 (C-2), 79.5 (C-3), 74.0 (C-1), 73.4 (CH₂-Bn), 72.0 (CH₂-Bn), 71.7 (CH₂-Bn), 71.4 (O-CH₂), 41.5 (C-4), 32.7 (C-5).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3447, 3030, 2930, 2862, 1496, 1454, 1362, 1206, 1090, 1074, 1027, 735, 697.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 441.2042, gefunden: 441.2140.

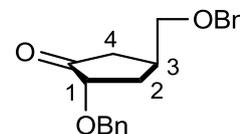
Versuch der Darstellung von (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*)-2,3-Benzyloxymethyl-4-(Benzyloxymethyl)-cyclopentanol 168

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 2.1 mg (55.0 μmol, 1.0 Äquiv.) Lithiumaluminiumhydrid in 1 mL abs. THF gelöst und auf -78°C gekühlt. Im Anschluss wurde langsam eine Lösung aus 23 mg (55 μmol, 1.0 Äquiv.) (2*S*,3*S*,4*S*)-2,3-bis(benzyloxy)-4-((benzyloxy)methyl)cyclopentan-1-one **171** in 2 mL abs. THF dazu getropft. Das Reaktionsgemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für 24 Stunden gerührt. Danach wurden bei 0°C langsam eine eisgekühlte 10%ige Natriumhydroxidlösung und 1 mL Wasser hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde im Anschluss mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde dreimal mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 4:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 6.9 mg (23 μmol, 42%) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₂₇H₃₀O₄

Molekulargewicht: 418.5247 g/mol



¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, CDCl₃): 7.42 – 7.24 (m, 10 H, *H*-Bn), 6.40 (d, ⁴*J*_{HH} = 2.9 Hz, 1H, *H*-3), 5.01 – 4.90 (m, 2H, CH₂-Bn), 4.51 (s, 2H, CH₂-Bn), 3.48 – 3.35 (m, 2H, *H*-6), 3.10 – 3.01 (m, 1H, *H*-4), 2.57 (dd, ²*J*_{HH} = 19.1, ³*J*_{HH} = 6.4 Hz, 1H, O-CH₂a), 2.17 (dd, ²*J*_{HH} = 19.2, ⁴*J*_{HH} = 2.0 Hz, 1H, O-CH₂b).

¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, CDCl₃): 129.6 (C-3), 128.7 (C-Bn), 128.6 (C-Bn), 128.4 (C-Bn), 127.9 (C-Bn), 127.8 (C-Bn), 127.7 (C-Bn), 73.5 (C-6), 73.5 (CH₂-Bn), 71.9 (CH₂-Bn), 37.3 (O-CH₂), 35.3 (C-4).

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 331.1304, gef.: 331.1309.

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3063, 3030, 2916, 2859, 1719, 1622, 1497, 1454, 1407, 1363, 1338, 1278, 1207, 1109, 1028, 999, 913, 841, 788, 739, 698, 488, 469, 458, 414.

Synthese von (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*)-2,3-Benzylloxymethyl-4-(Benzylloxymethyl)-cyclopentanol **168**

Unter Stickstoffatmosphäre wurden zu einer Suspension aus 51 mg (0.12 mmol, 1.5 Äquiv.) Dess-Martin-Periodinan **172** in abs. Dichlormethan bei 0 °C eine Lösung aus 34 mg (81 μ mol, 1.0 Äquiv.) von **171** in Dichlormethan langsam hinzugegeben. Nach 15 Minuten wurde die Kühlung entfernt und das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2.5 mL Diethylether und 2.5 mL einer Natriumhydrogencarbonatlösung, welche 110 mg Natriumthiosulfat enthielt, beendet. Die organische Phase wurde je dreimal mit einer Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde dann über Natriumthiosulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 4:1 v/v) gereinigt.

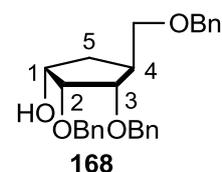
Im nächsten Reaktionsschritt wurden unter Schutzgasatmosphäre 27 mg (66 μ L, 1.0 Äquiv.) des Cyclopentanons **171** in Methanol gelöst und auf -78 °C gekühlt. Nach Zugabe von 32 mg (86 μ L, 1.3 Äquiv.) wurde das Reaktionsgemisch nach 10 Minuten mit 3 mg Natriumborhydrid (84 μ L, 1.3 Äquiv.) versetzt. Nach weiteren 15 Minuten wurde 1 mL gesättigte Ammoniumchloridlösung, sowie 10%ige Essigsäure hinzugefügt und das Reaktionsgemisch für eine weitere Stunde gerührt. Im Anschluss wurde das organische Lösungsmittel im Vakuum entfernt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE/EE 2:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 13 mg (31 μ mol, 49%) eines farblosen Öls.

Summenformel: C₂₇H₃₀O₄

Molekulargewicht: 418.5247 g/mol

DC: R_f (PE/EE 2:1, v/v): 0.28



¹H-NMR: δ [ppm] (600 MHz, CDCl₃): 7.37 – 7.25 (m, 15H, *H*-Bn), 4.73 (d, ²*J*_{HH} = 12.2 Hz, 1H, CH₂-Bn), 4.66 (dd, ²*J*_{HH} = 11.4 Hz, ³*J*_{HH} = 8.9 Hz, 2H, CH₂-Bn), 4.61 (d, ²*J*_{HH} = 12.2 Hz, 1H, CH₂-Bn), 4.46 (d, ⁴*J*_{HH} = 3.6 Hz, 1H, CH₂-Bn), 4.19 – 4.15 (m, 1H, *H*-1), 3.85 (t, ³*J*_{HH} = 4.4 Hz, 1H, *H*-3), 3.74 (t, ³*J*_{HH} = 4.4 Hz, 1H, *H*-2), 3.40 (dd, ³*J*_{HH} = 4.4 Hz, ³*J*_{HH} = 8.9 Hz, 1H, O-CH₂a), 3.28 (dd, ²*J*_{HH} = 9.2 Hz, ³*J*_{HH} = 6.1 Hz, 1H, O-CH₂b), 2.64 – 2.58 (m, 1H, *H*-4), 2.03 – 1.97 (m, 1H, *H*-5a), 1.61 – 1.55 (m, 1H, *H*-5b).

¹³C-NMR: δ [ppm] (151 MHz, CDCl₃): 138.5 (C_q-Bn), 138.5 (C_q-Bn), 138.4 (C_q-Bn), 128.5 (2xC-Bn), 128.5 (2xC-Bn), 128.5 (2xC-Bn), 128.0 (2xC-Bn), 127.9 (2xC-Bn), 127.8 (C-Bn), 127.7 (2xC-Bn), 127.6 (2xC-Bn), 81.1 (C-2), 80.5 (C-3), 73.2 (CH₂-Bn), 72.3 (CH₂-Bn), 72.2 (CH₂-Bn), 71.8 (C-1), 71.8 (O-CH₂), 42.2 (C-4), 33.7 (C-5).

IR: (Film) $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3515, 3062, 3030, 2929, 2860, 1496, 1454, 1359, 1207, 1100, 1064, 1028, 736, 697.

HR-ESI⁺-MS: (m/z) berechnet für [M+Na⁺]: 441.2042, gefunden: 441.2039.

8. Gefahrstoffverzeichnis

In der folgenden Zusammenstellung sind Verbindungen und Lösungsmittel aufgelistet, mit denen während der Promotion gearbeitet wurde. Im Verzeichnis sind für die entsprechenden Gefahrstoffstoffe die gültigen Gefahrenpiktogramme sowie die H- und P- Sätze angegeben. Stoffe bei denen keine bekannte Einstufung existiert, sind als gefährlich einzustufen. Daher ist die Kontamination der eigenen oder anderer Person sowie die Exposition in die Umwelt unbedingt zu vermeiden.

Substanz	Piktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Aceton		225-319-336	210-233-305+351+338
Acetonitril		225-332-302-312-319	210-305+351+338-403+235
Acrylamid		301-312-332-315-317-319-340-350-361f-372	201-280-302+352-304+351+338-308+310
AD-Mix α		315-319-335	261-305+351+338
AD-Mix β		315-319-335	261-305+351+338
Ammoniak		302-314-335-400	261-273-280-305+351+338-310
Ammoniumperoxydisulfat		272-302-315-317-319-334-335	280-302+352-304+341-305+351+338-342+311
9-BBN (0.5 M) in THF		225-260-319-335-351	210-231+232-280-304+340+312-337+313-370+378
Benzoessäure		315-318-372	280-302+352-305+351+338-314
Benzoylchlorid		302-312-331-314-317	280-301+330+331-303+361+353-304+340-310-305+351+338-310
Benzylbromid		319-335-315	305+351+338-302+352

GEFAHRSTOFFVERZEICHNIS

Benzyloxymethylchlorid		302-315-318-330-335-350-373	260-304+340-305+351+338-320-330-405-501
<i>tert</i> -Butanol		225-332-319-335	210-305+351+338-403+233
Chloroform-d ₁		302-315-319-331-336-351-361d-372	261-281-305+351+338-311
Dess-Martin-Periodinan		272-302+312+332-315-319-335	220-261-280-305+351+338
Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat		226-315-317-318-330-335	210-260-280-304+340+310-305+351+338+310-403+233
Dichlormethan		315-319-335-336-351-373	261-281-305+351+338
Diethylaminoschwefel-trifluorid		226-302+312+322-314	280-305+351+338-310
Diethylether		224-302-336	210-240-403+235
Diisopropylazodicarboxylat		315-319-335-351-373-411	261-273-281-305+351+338
2,2-Dimethoxypropan		225-319	210-305+351+338
<i>N,N</i> -Dimethylformamid		226-332-312-319-360D	201-302+352-305+351+338-308+313
Dimethyldichlorosilan		225-302-314-331	210-261-280-305+351+338-310
4-(Dimethylamino)-pyridin		301-310-315-319-335	280-301+310+330-302+352+310-304+340+312-305+351+338-337+313
Dimethylsulfoxid-d ₆		Kein gefährlicher Stoff nach GHS.	
Essigsäure		226-314	280-301+330+331-

GEFAHRSTOFFVERZEICHNIS

			305+351+338- 307+310-
Essigsäureethylester		225-319-336	210-240-305+351+338
<i>n</i> -Hexan		225-304-315-336- 361f-373-411	210-240-273-301+310- 331-302+352-403+235
Kalium- <i>tert</i> -butylat		228-252-302-314	210-223-280- 301+330+331- 305+351+338- 309+310-370+378- 402+404
Kieselgel		Kein gefährlicher Stoff nach GHS.	
Lithiumaluminiumhydrid		260-314	223-231+232-280- 305+351+338- 370+378-422
Methanol		225-301-311-331-370	210-233-280-302+352- 309+310
Methanol-d ₇		225-301-311-331-370	210-260-280-301+310- 311
Methansulfonamid		315-319-335	261-305+351+338
Methansulfonylchlorid		301-311-330-314	260-301+310- 303+361+353- 305+351+338-320-361- 405-501
<i>p</i> -Methoxybenzaldehyd		302	280
Methylamin (40%) in Wasser		225-302-314-331-335	210-261-280- 305+351+338-310
<i>N</i> -Methylmorpholin- <i>n</i> -oxid		315-319-335	261-305+351+338
Natriumborhydrid		260-301+311-314	280-301+330+331- 302+352- 305+351+338-

GEFAHRSTOFFVERZEICHNIS

309+310-402+404

Natriumchlorid		Kein gefährlicher Stoff nach GHS.	
Natriumcyclopentanediol (2 M) in THF		225-260-314-335-351	210-223-231+232-261-370+378-422
Natriumhydrid		260	223-231+232-370+378
Natriumhydrogencarbonat		Kein gefährlicher Stoff nach GHS.	
Natriumhydrogensulfid-Lösung (gesättigt)		302	264-270-312-301-330-501
Natriumhydroxid		290-314	280-301+330+331-305+351+338-308+310
Natriumnitrit		272-301-319-400	220-273-301+310-305+351+338
Natriumsulfat		Kein gefährlicher Stoff nach GHS.	
Natriumthiosulfat		Kein gefährlicher Stoff nach GHS.	
p-Nitrobenzoesäure		314	280-305+351+338-310
Oxone®		272-314-317-334-335	220-261-280-305+351+338-310
Palladium(II)-hydroxid auf Kohle		228	210-240-241-280-370+378
Petrolether (50-70)		225-304-315-336-361f-373-411	201-210-301+310-331-370+378-501
(-)-α-Pinen		226-315-319-335	261-305+351+338
iso-Propanol		225-319-336	210-233-305+351+338
Pyridin		225-332-302-312	210-233-302-352
Salzsäure (2 M)		290-318	305+351+338-310-390-406

GEFAHRSTOFFVERZEICHNIS

Tetrabutylammonium -fluorid (1 M in THF)		225-314-335-351	210-261-280- 305+351+338-310
Tetrabutylammo- niumiodid		302-315-319-335	261-305+351+338
Tetrahydrofuran		225-302-319-335-351	210-233-280-370+378- 501
Tetramethylethylen- diamin		225-302-314-332	210-280-305+351+338- 310
Toluol		225-304-315-336- 351d-373	210-240-301+310+330- 302+352-308+313-314- 403+233
Triethylamin		225-302-311+331-314- 335	210-280-303+361+353- 304+340-310- 305+351+338-403+233
Triphenylphosphin		302-317-413	262-273-280-302+352
Tris(hydroxymethyl)- aminomethan		Kein gefährlicher Stoff nach GHS.	
Wasserstoff		220-280	210-377-381-403
Wasserstoffperoxid (30%)		302-318	280-301+312+330- 305+351+338+310

9. Literaturverzeichnis

- [1] OECD Environmental Outlook to 2050: The Consequences of Inaction, **2012**, zu finden unter: www.oecd.org (letzter Zugriff 25.04.2017)
- [2] World Health Organization, AIDS: zu finden unter: www.who.int (letzter Zugriff 20.04.2017).
- [3] N. R. Nuno, A. Rambaut, M. A. Suchard, G. Baele, T. Bedford, M. J. Ward, A. J. Tatem, J. D. Sousa, N. Arinaminpathy, J. Pépin, D. Posada, M. Peeters, O. G. Pybus, P. Lemey, The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations; *Science* **2014**, *346*, 56-61.
- [4] R. C. Gallo, P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R.E. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch, M. Popovic, Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS), *Science* **1983**, *220*, 865-867.
- [5] R. C. Gallo, S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and at Risk for AIDS, *Science* **1984**, *224*, 500-503.
- [6] World Health Organization, Hepatitis B: zu finden unter: www.who.int (letzter Zugriff 20.04.2017).
- [7] M. Patlak, B. Blumberg, M. Hilleman, W. Rutter, The Hepatitis B Story, In: *Beyond Discovery(TM): The Path from Research to Human Benefit*, National Academy of Science; **2000**.
- [8] S. M. Schader, M. A. Wainberg, Insights into HIV-1 pathogenesis through drug discovery: 30 years of basic research and concerns for the future; *HIV & AIDS Review* **2011**, *10*, 91-98.
- [9] AIDSinfo, *Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents*, zu finden unter: www.aidsinfo.nih.gov (letzter Zugriff: 25.04.1017).
- [10] J. A. Esté, T. Cihlar, Current status and challenges of antiretroviral research and therapy, *Antiviral Res.* **2010**, *85*, 25-33.
- [11] S. Broder, The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic, *Antiviral Res.* **2010**, *85*, 1-18.
- [12] L. M. Mansky, Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation, *J. Gen. Virol.* **1998**, *79*, 1337-1345.
- [13] R. Sanjuán, M. R. Nebot, N. Chirico, L. M. Mansky, R. Belshaw, Viral Mutation Rates, *J. Virol.* **2010**, *84*, 9733-9748.
- [14] M. P. Davenport, L. Loh, J. Petracic, S. J. Kent, Rates of HIV immune escape and reversion: implications for vaccination, *Trends Microbiol.* 2008, *16*, 561–566.

- [15] Angelehnt an: E. De Clercq, Strategies in the Design of Antiviral Drugs, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, 1, 13-25.
- [16] J. Balzarini, P. Herdewijn, E. De Clercq, Differential Patterns of Intracellular Metabolism of 2',3'-Didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine, Two Potent Anti-Human Immunodeficiency Virus Compounds, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 6127-6133.
- [17] P. L. Boyer, J. G. Julias, Z. Ambrose, M. A. Siddiqui, V. E. Marquez, S. H. Hughes, The Nucleoside Analogs 40C-Methyl Thymidine and 40C-Ethyl Thymidine Block DNA Synthesis by Wild-Type HIV-1 RT and Excision Proficient NRTI Resistant RT Variants, *J. Mol. Biol.* **2007**, 371, 873-882.
- [18] P. L. Boyer, J. G. Julias, V. E. Marquez, S. H. Hughes, Fixed Conformation Nucleoside Analogs Effectively Inhibit Excision-Proficient HIV-1 Reverse Transcriptases, *J. Mol. Biol.* **2005**, 345, 441-450.
- [19] N. Sluis-Cremer, N. A. Temiz, I. Bahar; Conformational changes in HIV-1 reverse transcriptase induced by nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor binding, *Curr. HIV Res.* **2004**, 2, 323-332.
- [20] L. M. Mansky, Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation, *J. Gen. Virol.* **1998**, 79, 1337-1345.
- [21] L. Menendez-Arias, Mechanisms of Resistance to Nucleoside Analogue Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase, *Virus Res.* **2008**, 134, 124-146.
- [22] R. Krebs, U. Immendorfer, S. H. Thrall, B. M. Wohrl, R. S. Goody, Single Step Kinetics of HIV-1 Reverse Transcriptase Mutants Responsible for Virus Resistance to Nucleoside Inhibitors Zidovudine and 3-TC, *Biochemistry* **1997**, 36, 10292-10300.
- [23] D. Arion, N. Kaushik, S. McCormick, G. Borkow, M. A. Parniak, Phenotypic Mechanism of HIV-1 Resistance to 3'-Azido-3'-deoxythymidine (AZT): Increased Polymerization Processivity and Enhanced Sensitivity to Pyrophosphate of the Mutant Viral Reverse Transcriptase, *Biochemistry* **1998**, 37, 15908-15917.
- [24] P. R. Meyer, S. E. Matsuura, A. G. So, W. A. Scott, Unblocking of Chain-Terminated Primer by HIV-1 Reverse Transcriptase Through a Nucleotide-Dependent Mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95, 13471-13476.
- [25] D. Jochmans, Novel HIV-1 reverse transcriptase inhibitors, *Virus Res.* **2008**, 134, 171-185.
- [26] P. A. Furman, J. A. Fyfe, M. H. St Clair, K. Weinhold, J. L. Rideout, G.A. Freeman, S. N. Lehrman, D. P. Bolognesi, S. Broder, H. Mitsuya, Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, 83, 8333-8337.

- [27] E. De Clercq, A. Holý, Acyclic nucleoside phosphonates: A key class of antiviral drugs, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 928-940.
- [28] L. P. Jordheim, D. Durantel, F. Zoulim, C. Dumontet, Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 447-464.
- [29] J. W. Kim, S. H. Park, S. G. Louie, Telbivudine: a novel nucleoside analog for chronic hepatitis B, *Ann. Pharmacother.* **2006**, *40*, 472-478.
- [30] C. Mathe, G. Gosselin, L-Nucleoside enantiomers as antiviral drugs: A mini-review, *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 276-281.
- [31] V. Merlo, S. M. Roberts, R. Storer, R. C. Bethell, Synthesis and biological activity of the diphosphorylphosphonate derivatives of (+)- and (-)-*cis*-9-(4'-hydroxycyclopent-2'-enyl)guanine, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, *11*, 1477-1481.
- [32] S. M. Daluge, M. T. Martin, B. R. Sickles, D. A. Livingston, An Efficient, Scalable Synthesis of the HIV Reverse Transcriptase Inhibitor Ziagen[®] (1592U89), *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2000**, *19*, 297-327.
- [33] M. I. Lim, V. E. Marquez, Carbocyclic Nucleosides, *Med. Res. Rev.* **1986**, *6*, 1-40.
- [34] Angelehnt an: L. Agrofoglio, E. Suhas, A. Farese, R. Condom, S.R. Challand, R.A. Earl, R. Guedj, Synthesis of Carbocyclic Nucleosides, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 10611-10670.
- [35] C. Desgranges, G. Razaka, M. Rabaud, H. Bricaud, J. Balzarini, E. De Clercq, Phosphorolysis of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine (BVDU) and other 5-substituted-2'-deoxyuridines by purified human thymidine phosphorylase and intact blood platelets, *Biochem. Pharmacol.* **1983**, *32*, 3583-3590.
- [36] R. C. Cookson, P. J. Dudfield, R. F. Newton, P. Ravenscroft, D. I. C. Scopes, J. M. Cameron, (+)-Carbocyclic (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine: a potent antiherpes agent. *Eur. J. Med. Chem.-Chim. Ther.* **1985**, *20*, 375-377.
- [37] T. Kusaka, H. Yamamoto, M. Shibata, M. Muroi, T. Kishi, K. Mizuno, Streptomyces citricolor and a new antibiotic, aristeromycin. *J. Antibiot.* **1968**, *21*, 255-263.
- [38] S. Yaginuma, N. Muto, M. Tsujino, Y. Sudate, M. Hayashi, M. Otani, Studies on Neplanocin A, new antitumor antibiotic. I. Producing organism, isolation and characterization, *J. Antibiot.* **1981**, *34*, 359-365.
- [39] M. Hayashi, S. Yaginuma, Studies on Neplanocin A, New Antitumor Antibiotic. II. Structure Determination, *J. Antibiot.* **1981**, *34*, 675-680.
- [40] G. Y. Song, V. Paul, H. Choo, J. Morrey, R. W. Sidwell, R. F. Schinazi, C. K. Chu, Enantiomeric Synthesis of D- and L-Cyclopentenyl Nucleosides and Their Antiviral Activity Against HIV and West Nile Virus, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3985-3993.

- [41] R. T. Borchart, B. T. Keller, U. Patel-Thombre, Neplanocin A. A potent inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase and of vaccinia virus multiplication in mouse L929 cells. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 4353-4358.
- [42] E. de Clercq, Antiviral and antimetabolic activities of neplanocins, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *28*, 84-89.
- [43] https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/20-977_Ziagen.cfm. (letzter Zugriff 15.05.2017).
- [44] S. M. Daluge, M. T. Martin, B. R. Sickles, D. A. Livingston, An Efficient, Scalable Synthesis of the HIV Reverse Transcriptase Inhibitor Ziagen[®] (1592U89), *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2000**, *19*, 297-327.
- [45] R. Vince, M. Hua, J. Brownell, S. Daluge, F. Lee, W. M. Shannon, G. C. Lavelle, J. Qualls, O. S. Weislow, R. Kiser, P. G. Canonico, R. H. Schultz, V. L. Narayaan, J. G. Mayo, R. H. Shoemaker, M. R. Boyd, Potent and Selective Activity of a New Carbocyclic Nucleoside Analog (Carbovir: NSC 614846) Against Human Immunodeficiency Virus In Vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *156*, 1046-1053.
- [46] L. L. Jr. Bondoc, W. M. Shannon, J. A. Secrist III, R. Vince, A. Fridland, Metabolism of the carbocyclic nucleoside analogue carbovir, an inhibitor of human immunodeficiency virus, in human lymphoid cells, *Biochemistry* **1990**, *29*, 9839-9843.
- [47] E. L. Asahchop, M. A. Wainberg, R. D. Sloan, C. L. Tremblay, Antiviral Drug Resistance and the Need for Development of New HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 5000-5008.
- [48] <https://www.drugs.com/history/baraclude.html>, (letzter Zugriff 15.05.2017).
- [49] G. S. Bisacchi, S. T. Chao, C. Baccard, J. P. Daris, S. Innaimo, G. A. Jacobs, O. Kocy, P. Lapointe, A. Martel, Z. Merchant, W. A. Slusarchyk, M. G. Young, R. Colonno, R. Zahler, BMS-200475, A Novel Carbocyclic 2'-Deoxyguanosine Analog with Potent and Selective Anti-Hepatitis B Virus Activity in Vitro, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 127-132.
- [50] D. R. Langley, A. W. Walsh, C. J. Baldick, B. J. Eggers, R. E. Rose, S. M. Levine, A. J. Kapur, R. J. Colonno, D. J. Tenney, Inhibition of Hepatitis B Virus Polymerase by Entecavir, *J. Virol.* **2007**, *81*, 3992-4001.
- [51] Y. F. Shealy, C. A. O'Dell, Synthesis of the Carbocyclic Analogs of Uracil Nucleosides, *J. Heterocycl. Chem.* **1976**, *13*, 1015-1020.
- [52] J. Béres, G. Sági, I. Tömösközi, L. Gruber, E. Baitz-Gacs, L. Ötvös, E. De Clercq, Stereospecific Synthesis and Antiviral Properties of Different Enantiomerically Pure Carbocyclic 2'-deoxyribonucleoside Analogs Derived from common Chiral Pools: (+)-(1R,5S)- and (-)-(1S,5R)-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-3-one, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1353-1360.

- [53] P. Boyer, B. Vu, Z. Ambrose, J. G. Julias, S. Warnecke, C. Liao, C. Meier, V. E. Marquez, S. H. Hughes, The Nucleoside Analog D-carba T Blocks HIV-1 Reverse Transcription, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5356-5364.
- [54] O. R. Ludek, T. Kraemer, J. Balzarini, C. Meier, Divergent Synthesis and Biological Evaluation of Carbocyclic alpha-, iso- and 3'-epi-nucleosides and Their Lipophilic Nucleotide Prodrugs, *Synthesis* **2006**, *8*, 1313-1324.
- [55] M. Mahler, B. Reichardt, P. Hartjen, J. van Lunzen, C. Meier, Stereoselective Synthesis of D- and L-Carbocyclic Nucleosides by Enzymatically Catalyzed Kinetic Resolution, *Chem. Eur. J.* **2012**, *35*, 11046-11062.
- [56] N. Katagiri, M. Nomura, H. Sato, C. Kaneko, K. Yusa, T. Tsuruo, Synthesis and anti-HIV Activity of 9-[c-4,t-5-bis(hydroxymethyl)cyclopent-2-en-r-1-yl]-9H-adenine *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1882-1886.
- [57] C. T. Evans, S. M. Roberts, K. A. Shoberu, A. G. Sutherland, Potential Use of Carbocyclic Nucleosides for the Treatment of AIDS: Chemo-Enzymatic Syntheses of the En-antiomers of Carbovir, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, *5*, 589-592.
- [58] G. Shaw, R. V. Warrener, Purines, Pyrimidines, and Glyoxalines, VII. New Synthesis of 2-Thiouracils and 2-Thiothymines, *J. Chem. Soc.* **1958**, 153-156.
- [59] O. Mitsunobu, The Use of Diethyl Azodicarboxylate and Triphenylphosphine in Synthesis and Transformation of Natural Products, *Synthesis* 1981, *1*, 1-28.
- [60] S. F. Martin, J. A. Dodge, Efficacious Modification of the Mitsunobu Reaction for Inversions of Sterically Hindered Secondary Alcohols, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3017-3020.
- [61] J. Wachtmeister, B. Classon, B. Samuelsson, I. Kvarnstrom, Synthesis of Novel Olefinic Carbocyclic Purine Nucleoside Analogs, *Nucl.* **1995**, *14*, 405-408.
- [62] K. C. K. Swamy, N. N. B. Kumar, E. Balaraman, K. V. P. P. Kumar, Mitsunobu and Related Reactions: Advances and Applications, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2551-2651.
- [63] D. Deville-Bonne, C. el Amri, P. Meyer, Y. Chen, L.A. Agrofoglio, J. Janin, Human and viral nucleoside/nucleotide kinases involved in antiviral drug activation: Structural and catalytic properties, *Antiviral Res.* **2010**, *86*, 101-120.
- [64] N. G. Johansson, S. Eriksson, Structure-activity relationships for phosphorylation of nucleoside analogs to monophosphates by nucleoside kinases. *Acta Biochim. Pol.* **1996**, *43*, 143-160.
- [65] A. R. Van Rompay, M. Johansson, A. Karlsson, Phosphorylation of nucleosides and nucleoside analogs by mammalian nucleoside monophosphate kinases. *Pharmacol. Ther.* **2000**, *87*, 189-198.

- [66] J. Bourdais, R. Biondi, S. Sarfati, C. Guerreiro, I. Lascu, J. Janin, M. Veron, Cellular phosphorylation of anti-HIV nucleosides, Role of nucleoside diphosphate kinase. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 7887-7890.
- [67] V.E. Marquez, M.A. Siddiqui, A. Ezzitouni, P. Russ, J. Wang, R.W. Wagner, M.D. Matteucci, Nucleosides with a Twist. Can Fixed Forms of Sugar Ring Pucker Influence Biological Activity in Nucleosides and Oligonucleotides, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3739-3747.
- [68] A. Wu, D. Cremer, A. A. Auer, J. Gauss, Extension of the Karplus Relationship for NMR Spin-Spin Coupling Constants to Nonplanar Ring Systems: Pseudorotation of Cyclopentane, *J. Phys. Chem.* **2002**, *106*, 657-667.
- [69] H. R. Moon, H. Ford Jr., E. Marquez, A Remarkably Simple Chemicoenzymatic Approach to Structurally Complex Bicyclo[3.1.0]hexane Carbocyclic Nucleosides, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3793-3796.
- [70] A. Albert, Chemical aspects of selective toxicity. *Nature* **1958**, *182*, 421-423.
- [71] U. Pradere, E. C. Garnier-Amblard, S. J. Coats, F. Amblard, R. F. Schinazi, Synthesis of nucleoside phosphate and phosphonate prodrugs; *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 9154-9218.
- [72] T. Schulz, Synthese und Untersuchung von Nucleosiddiphosphat Prodrugs, *Dissertation* **2011**, Universität Hamburg.
- [73] T. Gollnest, Das TriPPPPro-Konzept: Entwicklung und Charakterisierung von antiviralen Nucleosidtriphosphat-Prodrugs, *Dissertation* **2011**, Universität Hamburg.
- [74] T. Gollnest, T. Dinis de Oliveira, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, The TriPPPPro-approach: Lipophilic prodrugs of nucleoside triphosphates as biochemical probes and potential antivirals, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8716.
- [75] T. Gollnest, T. Dinis de Oliveira, A. Rath, I. Hauber, D. Schols, J. Balzarini, C. Meier, Membrane-permeable Triphosphate Prodrugs of Nucleoside Analogues, *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 5341-5344.
- [76] G. Moyle, Toxicity of antiretroviral nucleoside and nucleotide analogues: is mitochondrial toxicity the only mechanism?, *Drug Saf.* **2000**, *23*, 467-481.
- [77] T. A. Kunkel, K. Bebenek, DNA replication fidelity, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 497-529.
- [78] M. A. Graziewicz, M. J. Longley, W. C. Copeland, DNA Polymerase γ in Mitochondrial DNA Replication and Repair, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 383-405.
- [79] I. R. Lehmann, Discovery of DNA Polymerase, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 34733-34738.
- [80] C. M. Joyce, T. A. Steitz, Function and structure relationships in DNA polymerases, *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, *63*, 777-822.

- [81] C. A. Bräutigam, T. A. Steitz, Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 54–63.
- [82] M. R. Sawaya, H. Pelletier, A. Kumar, S. H. Wilson, J. Kraut, Crystal-Structure of rat dna-polymerase-beta - evidence for a common polymerase mechanism, *Science* **1994**, *264*, 1930-1935.
- [83] J. Wang, A. K. M. A.Sattar, C. C. Wang, J. D. Karam, W. H. Konigsberg, T. A. Steitz, Crystal structure of a pol alpha family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69, *Cell* **1997**, *89*, 1087-1099.
- [84] A. J. Berdis, DNA Polymerases as Therapeutic Targets, *Biochem.* **2008**, *47*, 8253–8260.
- [85] L. S. Beese, T. A. Steitz, Structural basis for the 3´-5´exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism, *EMBO J.* **1991**, *10*, 25-33.
- [86] J. Cline, J. C. Braman, H. H. Hogrefe, PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases, *Nucleic. Acid. Res.* **1996**, *24*, 3546-3551.
- [87] S. D. McCulloch, T. Kunkel, The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases, *Cell Res.* **2008**, *18*, 148-161.
- [88] E. E. Henninger, Z. F. Pursell, DNA Polymerase ϵ and Its Roles in Genome Stability, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* **2014**, *66*, 339-351.
- [89] K. S. Murakami, M. A. Trakselis, *Nucleic acid polymerases*, *30*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, **2014**, S. 2.
- [90] K. Bebenek, T. A. Kunkel, Functions of DNA Polymerases **2004**, *69*, 137-165.
- [91] B. G. Turner, M.F. Summers, Structural biology of HIV, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 1-32.
- [92] A. J. Molina, E. Arnold, HIV reverse transcriptase structure-function relationships, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6351–6361.
- [93] J. Balzarini, Metabolism and mechanism of antiretroviral action of purine and pyrimidine derivatives, *Pharm. World Sci.* **1994**, *16*, 113-126.
- [94] S. Jessel, Stereoselektive Synthese carbocyclischer Nucleosidanaloga, *Dissertation* **2010**, Universität Hamburg.
- [95] K. Biggadike, A. D. Borthwick, D. Evans, A. M. Exall, B. E. Kirk, S. M. Roberts, L. Stephenson, P. J. Youds, Use of Diethylsulphur Trifluoride (DAST) in the Preparation of Synthons of Carbocyclic Nucleosides, *Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1988**, 549-554.
- [96] O. R. Ludek, C. Meier, New convergent synthesis of carbocyclic nucleoside analogues, *Synthesis* **2003**, *13*, 2101-2109.

- [97] S. Weising, Stereoselektive Synthese einer Vorstufe für carbocyclische Nucleosidanaloga, *Masterarbeit* **2013**, Universität Hamburg.
- [98] M. Mahler, Synthese antiviral aktiver carbocyclischer Nucleosid und Nucleotidanaloga, *Dissertation* **2013**, Universität Hamburg.
- [99] R. Brückner, Reaktionsmechanismen, 3. Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, **2007**.
- [100] O. R. Ludek, Synthese carbocyclischer Analoga des Thymidylats für Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen an Thymidylatkinasen, *Dissertation* **2015**, Universität Hamburg.
- [101] H. J. Jessen, Untersuchungen zur intrazellulären Freisetzung von Nucleosidphosphaten, *Dissertation* **2008**, Universität Hamburg.
- [102] E. H. Rios Morales, Stereoselektive Darstellung von cycloSal-Pronucleotiden mittels chiraler Austrittsgruppen, *Dissertation* **2010**, Universität Hamburg.
- [103] N. D. Sinha, J. Biernat, H. Köster, β -Cyanoethyl *N,N*-dialkylamino/*N*-morpholinomonochloro phosphoamidites, new phosphitylating agents facilitating ease of deprotection and work-up of synthesized oligonucleotides, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5843-5846.
- [104] <https://www.mpibpc.mpg.de/57005/DNA-Schmelzkurve>, (letzter Zugriff 15.05.2017).
- [105] J. D. Puglisi, I. Tinoco, Absorbance melting curves of RNA, *Methods Enzymol.* **1989**, *180*, 304-325.
- [106] J. L. Mergny, L. Lacroix, Analysis of Thermal Melting Curves, *Oligonucleotides* **2003**, *13*, 515-537.
- [107] E. S. Baker, M. T. Bowers, B-DNA Helix Stability in a Solvent-Free Environment, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom* **2007**, *18*, 1188-1195.
- [108] G. L. Beilhartz, M. Götte, HIV-1 Ribonuclease H: Structure, Catalytic Mechanism and Inhibitors, *Viruses* **2010**, *2*, 900-926.
- [109] S. G. Sarafianos, B. Marchand, K. Das, D. Himmel, M. A. Parniak, S. H. Hughes, E. Arnold, Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition, *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 693–713.
- [110] Angelehnt an: <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/cdna/2176>.
- [111] J. R. Kiefer, C. Mao, J. C. Braman, L. S. Beese, Visualizing DNA replication in a catalytically active Bacillus DNA polymerase crystal, *Nature* **1998**, *391*, 304-307.
- [112] V. E. Marquez, T. Ben-Kasus, J. J. Barchi Jr., K. M. Green, M. C. Nicklaus, R. Agbaria, Experimental and Structural Evidence that Herpes 1 Kinase and Cellular DNA Polymerase(s) Discriminate on the Basis of Sugar Pucker, *J. Am. Chem Soc.* **2004**, *126*, 543-9.

- [113] S. J. Johnson, L. S. Beese, Structures of Mismatch Replication Errors Observed in a DNA Polymerase, *Cell* **2004**, *116*, 803-816.
- [114] S. G. Sarafianos, Jr. A. D. Clark, K. Das, S. Tuske, J. J. Birktoft, P. Ilankumaran, A. R. Ramesha, J. M. Sayer, D. M. Jerina, P. L. Boyer, S. H. Hughes, E. Arnold, Structures of HIV-1 reverse transcriptase with pre- and post-translocation AZTMP-terminated DNA, *EMBO J.* **2002**, *21*, 6614–6624.
- [115] J. Béres, G. Sági, I. Tömösközi, L. Gruber, E. Baitz-Gacs, L. Ötvös, E. De Clercq; Stereospecific Synthesis and Antiviral Properties of Different Enantiomerically Pure Carbocyclic 2'-deoxyribonucleoside Analogs Derived from common Chiral Pools: (+)-(1R,5S)- and (-)-(1S,5R)-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-6-en-3-one, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1353-1360.
- [116] E. C. Moore, R. B. Hurlbert, Regulation of mammalian deoxyribonucleotide biosynthesis by nucleotides as activators and inhibitors, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 4802-4809.
- [117] J. Yamtich, J. B. Sweasy, DNA polymerase Family X: Function, structure, and cellular roles, *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1804*, 1136-1150.
- [118] K. Tanabe, E. W. Bohn, S. H. Wilson, Steady-state kinetics of mouse DNA polymerase beta, *Biochemistry* **1979**, *18*, 3401-3406.
- [119] K. M. Chou, Y. C. Cheng, An exonucleolytic activity of human apurinic/ apyrimidinic endonuclease on 3' mispaired DNA, *Nature* **2002**, *415*, 655-659.
- [120] J. D. Stumpf, W. C. Copeland, Mitochondrial DNA replication and disease: insights from DNA polymerase γ mutations, *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, *68*, 219–233.
- [121] A. Lavie, I. R. Vetter, M. Konrad, R. S. Goody, J. Reinstein, I. Schlichting, Structure of thymidylate kinase reveals the cause behind the limiting step in AZT activation. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 601-604.
- [122] J. M. Cuevas, R. Geller, R. Garijo, J. López-Aldeguer, R. Sanjuán, Extremely High Mutation Rate of HIV-1 In Vivo, *PLoS Biol.* **2015**, *13*, 1-19.
- [123] E. T. Kool, Active site tightness and substrate fit in DNA replication, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 191-219.
- [124] M. C. Dalakas, I. Illa, G. H. Pezeshkpour, J. P. Laukaitis, B. Cohen, J. L. Griffin Mitochondrial Myopathy Caused by Long-Term Zidovudine Therapy, *N. Engl. J. Med.* **1990**, *322*, 1098-1105.
- [125] W. Copeland, The Mitochondrial DNA Polymerase in Health and Disease, *Subcell. Biochem.* **2010**, *50*, 211–222.
- [126] S. E. Lim, W. C. Copeland, Differential Incorporation and Removal of Antiviral Deoxynucleotides by Human DNA Polymerase γ , *J. Bio. Chem.* **2001**, *276*, 23616-23623.

- [127] T. Cihlar, A. S. Ray, Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine, *Antiviral Res.* **2010**, *85*, 39-58.
- [128] L. A. Alexandrova, A. Y. Skoblov, M. V. Jasko, L. S. Victorova, A. A. Krayevsky, 2'-Deoxynucleoside 5'-triphosphates modified at α -, β -and γ -phosphates as substrates for DNA polymerases, *Nucl. Acids Res.* **1998**, *26*, 778-786.
- [129] A. Krayevsky, A. Arzumanov, E. Shirokova, N. Dyatkina, L. Victorova, M. J. Alexandrova, L. Alexandrova, dNTP Modified at Triphosphate Residues: Substrate Properties Towards DNA Polymerases and Stability in Human Serum, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **1998**, *3*, 681-693.
- [130] A. A. Arzumanov, D. G. Semizarov, L. S. Victorova, N. B. Dyatkina, A. A. Krayevsky, γ -Phosphate-substituted 2'-Deoxynucleoside 5'-Triphosphates as Substrates for DNA Polymerases, *J. Bio. Chem.* **1996**, *271*, 24389-24394.
- [131] L. S. Victorova, D. G. Semizarov, E. A. Shirokova, L. A. Alexandrova, A. A. Arzumanov, M. V. Jasko Krayevsky, A. A. Krayevsky, Human DNA Polymerases and Retroviral Reverse Transcriptases: Selectivity in Respect to dNTPs Modified at Triphosphate Residues, *Nucleosides and Nucleotides* **1999**, *18*, 1031-1032.
- [132] R. D. Fleischer, A. S. Lok, Myopathy and neuropathy associated with nucleos(t)ide analog therapy for hepatitis B., *J. Hepatol.* **2009**, Band 51, 787-791.
- [133] B. K. Kim, J. Oh, S. Y. Kwon, W. H. Choe, S. Y. Ko, K. H. Rhee, T. H. Seo, S. D. Lim, C. H. Lee, Clevudine myopathy in patients with chronic hepatitis B, *J. Hepatol.* **2009**, Band 51, 829-834.
- [134] J. I. Seok, D. K. Lee, C. H. Lee, M. S. Park, S. Y. Kim, H. S. Kim, H. Y. Jo, C. H. Lee, D. S. Kim: Long-term therapy with clevudine for chronic hepatitis B can be associated with myopathy characterized by depletion of mitochondrial DNA, *Hepatology* **2009**, Band 49, 2080-2086.
- [135] G.-Q. Yao, S.-H. Liu, E. Chou, M. Kukhanova, C. K. Chu, Y.-C. Cheng, Inhibition of Epstein-Barr virus replication by a novel L-nucleoside, 2'-fluoro-5-methyl-beta-Larabinofuranosyluracil, *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *51*, 941-947.
- [136] Y. Chong, C. K. Chu, Understanding the unique mechanism of L-FMAU (Clevudine) against hepatitis B virus: molecular dynamics studies, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3459-3462.
- [137] K. Biggadike, A. D. Borthwick, D. Evans, A. M. Exall, B. E. Kirk, S. M. Roberts, L. Stephenson, P. Youds, A. M. Z. Slawin, D. J. Williams, Synthesis of fluorinated carbocyclic nucleosides: preparation of (\pm)-carbocyclic-FMAU and some congeners, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1987**, 251-254.
- [138] K. Pankiewicz, Fluorinated nucleosides, *Carb. Res.* **2000**, *327*, 87-105.

- [139] K. Biggadike, A. D. Borthwick, D. Evans, A. M. Exall, B. E. Kirk, Stanley M. Robberts, L. Stephenson, P. Youds, A. M. Z. Slawin, D. J. Williams, Synthesis of fluorinated carbocyclic nucleosides: preparation of (\pm)-carbocyclic-FMAU and some congeners, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1987**, 251-254.
- [140] O. R. Ludek, C. Meier, New convergent synthesis of carbocyclic nucleoside analogues, *Synthesis* **2003**, 13, 2101-2109.
- [141] S. Weising, Stereoselektive Synthese einer Vorstufe für carbocyclische Nucleosid-analoga, *Masterarbeit*, Hamburg **2013**.
- [142] G. Negrón, F. Vásquez, G. Galderón, R. Cruz, R. Gavino, G. Islas, Efficient Desilylation of some Nucleoside Derivatives with Potassium tert-Butoxide in Dimethylformamide, *Synth. Commun.* **1998**, 28, 3021-3027.
- [143] K. W. Pankiewicz, K. A. Watanabe, Synthesis of 2 β -fluoro-substituted nucleosides by a direct approach, *J. Fluor. Chem.* **1993**, 64, 15-36.
- [144] H. Becker, K. B. Sharpless, A new ligand class for the asymmetric dihydroxylation of olefins, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 448-51.
- [145] K. B. Sharpless, W. Amberg, Y. L. Bennani, G. A. Crispino, J. Hartung, K.-S. Jeong, H.-L. Kwong, K. Morikawa, Z.-M. Wanh, D. Xu, X.-L. Zhang, The Osmium-Catalyzed Asymmetric Dihydroxylation: A New Ligand Class and a Process Improvement, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2768-2771.
- [146] H. C. Kolb, M. S. Van Nieuwenhze, K. B. Sharpless, Catalytic Asymmetric Dihydroxylation, *Chem. Rev.* **1994**, 94, 2483-2547.
- [147] W. T. Markiewicz, Tetraisopropylidisiloxane-1,3,-diyl, a Group for Simultaneous Protection of 3',5'-Hydroxy Functions of Nucleosides, *J. Chem. Res. Synop.* **1979**, 1, 24-25.
- [148] K. Biggadike, A. D. Borthwick, D. Evans, A. M. Exall, B. E. Kirk, S. M. Roberts, L. Stephenson, P. Youds, Use of diethylaminosulfur trifluoride (DAST) in the preparation of synthons of carbocyclic nucleosides, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1988**, 549-54.
- [149] G. Kowolik, K. Gaertner, G. Etzold, P. Langen, Nucleoside von fluor-zuckern: Teil III. Synthese 5'-fluorsubstituierter desoxyribonucleoside, *Carbohydr Res.* **1970**, 12, 301-311.
- [150] U. S. Singh, R. C. Mishra, R. Shankar, C. K. Chu, Stereoselective Synthesis of 2'-Fluoro-6'-methylene Carbocyclic Adenosine via Vince Lactam, *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 3917-3923.
- [151] V. Vanrheenen, R. C. Kelly, D. Y. Cha, An improved catalytic OsO₄ oxidation of olefins to -1,2-glycols using tertiary amine oxides as the oxidant, *Tetrahedron. Lett.* **1973**, 17, 1973-1976.

- [152] W. Herbst, K. Hunger, Industrial Organic Pigments: Production, Properties, Applications, Wiley-VCH Verlag **2004**, 3. Auflage, 195.
- [153] E. V. Anslyn, D. A. Dougherty, Modern Physical Organic Chemistry, *University Science Books* **2006**, 33, 289-291.
- [154] R. Brückner, Reaktionsmechanismen, *Spektrum*, **2004**, 3. Auflage, 54-91, 162-190, 606.
- [155] P. Y. Bruice, Organische Chemie: Studieren kompakt, Pearson Studium, 5. akt. Auflage **2011**, 365.
- [156] K. P. C. Vollhardt, N. E. Schore, Organische Chemie, Wiley-VCH Verlag **2011**, 5. Auflage, 287-301.
- [157] E. Breitmaier, G. Jung, Organische Chemie, Thieme Verlag **2012**, 7. vollst. überarb. und erw. 12. Auflage, 194-195.
- [158] G. Malik, X. Guinchard, D. Crich, Asymmetric Synthesis of Polyhydroxylated *N*-Alkoxy-piperidines by Ring Closing Double Reductive Amination; Facile Preparation of Isofagomine and Analogues, *Org. Lett.* **2012**, 14, 596–599.
- [159] C. S. Callam, T. L. Lowary, Synthesis and Conformational Investigation of Methyl 4a-Carba-D-arabinofuranosides, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 8961-8972.
- [160] D. B. Dess, J. C. Martin, Readily accessible 12-I-5 oxidant for the conversion of primary and secondary alcohols to aldehydes and ketones, *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 4155–4156.
- [161] D. B. Dess, J. C. Martin, A Useful 12-I-5 Triacetoxyperiodinane (the Dess-Martin Periodinane) for the Selective Oxidation of Primary or Secondary Alcohols and a Variety of Related 12-I-5 Species, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7277-7287.
- [162] R. E. Ireland, L. Liu, An Improved Procedure for the Preparation of the Dess-Martin Periodinane, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 2899.
- [163] P. Brémond, G. Audran, Y. Aubin, H. Monti, Total chemoenzymatic synthesis of (-)-3'-methylaristeromycin, *Synlett* **2007**, 7, 1124-1126.
- [164] M. B. Smith, *Organic Synthesis*, Academic Press, Oxford, **2010**, S. 350-385.
- [165] J. L. Luche, Lanthanides in organic chemistry. 1. Selective 1,2 reductions of conjugated ketones, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 2226–2227.

10. Anhang

10.1 Synthese-Protokoll für unmodifizierte DNA

In den nachfolgenden zwei Tabellen sind Synthese-Protokolle zur Darstellung der Olinucleotide **53-55** gezeigt.

Tabelle 13: Synthese-Protokoll für unmodifizierte DNA-Oligonucleotide.

Schritt	Aktion	Zeit [s]	Schritt	Aktion	Zeit [s]
1	DCA to TRM	2	33	ACN to Col	1
2	Wait	10	34	Gas to Col	3.5
3	DCA to TRM	2	35	Gas to Waste	2
4	Wait	10	36	Oxi to Col	5
5	DCA to Col	3.5	37	ACN to Waste	1
6	Wait	10	38	Wait	60
7	DCA to Col	3	39	Gas to Col	3
8	Wait	5	40	ACN to Waste	0.2
9	Gas to TRM	3	41	ACN to Col	2
10	ACN to Waste	0.2	42	Wait	4
11	ACN to Col	1.9	43	ACN to Col	1.5
12	Wait	4	44	Wait	5
13	Gas to TRM	3	45	Gas to Col	3
14	ACN to Waste	0.2	46	ACN to Waste	0.2
15	ACN to Col	3.5	47	ACN to Col	1.5
16	Wait	5	48	Gas to Waste	1
17	Gas to Waste	1	49	Gas to Col	3
18	Gas to Col	3.5	50	Cap A_B to Col	2.5
19	BMT to Col	0.2	51	Wait	30
20	Wait	2	52	Cap A_B to Col	1.5
21	AMD to Col	0.1	53	Wait	40
22	AMD BTT to Col	1.4	54	Gas to Col	2
23	Wait	25	55	ACN to Waste	0.2
24	AMD to Col	0.1	56	ACN to Col	30
25	AMD BTT to Col	1.2	57	Gas to Col	3
26	Wait	35	58	ACN to Waste	0.2
27	ACN to Waste	2	59	ACN to Col	3
28	Gas to Waste	2	60	Wait	2
29	Wait	17	61	Gas to Waste	1.5
30	Gas to Top	21	62	Wait	0.2
31	Wait	21	63	Gas to Col	3
32	ACN to Waste	1			

Sobald die Modifikation **25** in den DNA Strang eingebaut werden sollte, wurden die Schritte 65-74 verwendet, anstatt der Schritte 21-28.

Tabelle 14: Synthese-Protokoll für modifizierte DNA-Oligonucleotide.

Schritt	Aktion	Zeit [s]	Schritt	Aktion	Zeit [s]
65	AMD to Col	1	70	Wait	199
66	AMD BTT to	0.8	71	AMD BTT to Col	0.8
67	Wait	199	72	Wait	199
68	AMD to Col	0.1	73	ACN to Waste	2
69	AMD BTT to	0.8	74	Gas to Waste	2

In den nachfolgenden zwei Tabellen sind Synthese-Protokolle zur Darstellung der Olinucleotide **71** und **72** gezeigt.

Tabelle15: Synthese-Protokoll für unmodifizierte DNA-Oligonucleotide.

Schritt	Aktion	Zeit [s]	Schritt	Aktion	Zeit [s]
1	TCA to TRM	1.2	31	ACN to Waste	1
2	Wait	10	32	ACN to Col	1
3	TCA to TRM	1.4	33	Gas to Col	3.5
4	Wait	10	34	Gas to Waste	2
5	TCA to TRM	1.8	35	Oxi to Col	2
6	Wait	12	36	ACN to Waste	1
7	TCA to TRM	2	37	Wait	9
8	Wait	12	38	Wait	9
9	Gas to TRM	3	39	Gas to Col	3
10	ACN to Waste	0.2	40	ACN to Waste	0.2
11	ACN to TRM	4	41	ACN to Col	1.6
12	Gas to TRM	3	42	Wait	2
13	ACN to Waste	0.2	43	Gas to Col	3
14	ACN to Col	3.5	44	ACN to Waste	0.2
15	Wait	5	45	ACN to Col	1.5
16	Gas to Waste	1	46	Wait	4
17	Gas to Col	3.5	47	ACN to Col	1.5
18	Gas to Col	1.5	48	Wait	5
19	Wait	2	49	Gas to Waste	1
20	BTT to Col	0.4	50	Gas to Col	3
21	Wait	2	51	Cap A _B to COL	2
22	AMD to Col	0.1	52	Wait	15
23	AMD BTT to	1	53	Cap A _B to COL	3
24	Wait	6	54	Wait	15
25	AMD BTT to	0.4	55	Gas to Col	2
26	ACN to Waste	2	56	ACN to Waste	0.2
27	Gas to Waste	2	57	ACN to Col	1.2
28	Wait	55	58	Wait	2
29	Gas to CTop	0.1	59	Gas to Waste	1
30	Wait	55	60	Gas to Col	3

Sobald die Modifikation **25** in den DNA Strang eingebaut werden sollte, wurden die Schritte 50-61 verwendet, anstatt der Schritte 22-27.

Tabelle 16: Synthese-Protokoll für modifizierte DNA-Oligonucleotide.

Schritt	Aktion	Zeit [s]	Schritt	Aktion	Zeit [s]
50	AMD to Col	0.1	56	AMD BTT to Col	0.6
51	AMD BTT to	0.6	57	Wait	180
52	Wait	180	58	AMD BTT to Col	0.7
53	BTT to Col	0.4	59	Wait	180
54	Wait	2	60	ACN to Waste	2
55	AMD to Col	0.1	61	Gas to Waste	2

10.2 Weitere Autoradiogramme der *primer extension assays*

In Ergänzung des Kapitels 6.1.3.3.2 sind nachfolgend weitere Autoradiogramme der *standing-start* Reaktionen mit sich anschließender homogener Sequenz gezeigt.

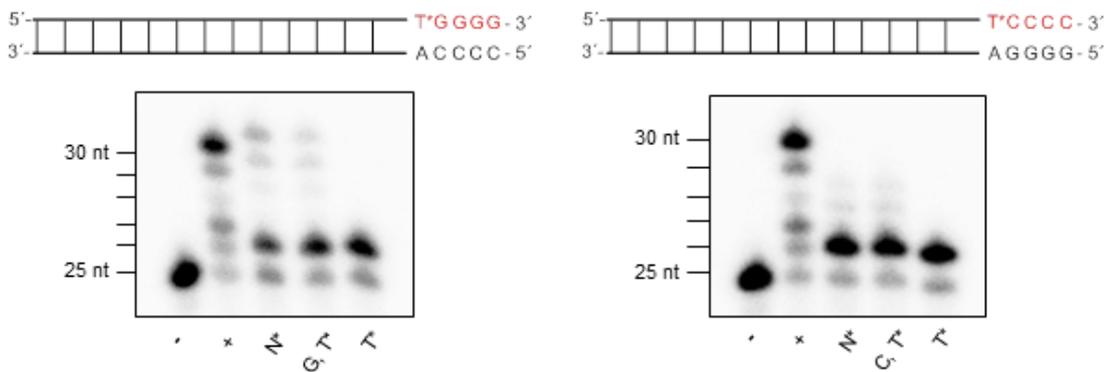


Abbildung 160: Autoradiogramme der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese zur Untersuchung des Einflusses homologer Reihen (-ACCCC, -AGGGG)

11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Chris Meier für die interessante Themenstellung und das gute Arbeitsumfeld. Ich möchte Ihnen an dieser Stelle auch sehr herzlich für das entgegengebrachte Vertrauen, die Ermöglichung einer spannenden Konferenzteilnahme sowie die fachlichen Diskussion danken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wittko Franke danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Herrn Prof. Dr. Sascha Rohn sowie Herrn Dr. Thomas Hackl danke ich für die Teilnahme am Dissertationskolloquium.

Prof. Dr. Dominique Schols danke ich für die Durchführung der antiviralen Tests. Herrn Dr. Markus Müller danke ich für die kristallografischen Messungen sowie Auswertungen.

Allen Mitgliedern der MS- und NMR-Abteilung unter der Leitung von Frau Dr. Maria Riedner sowie Herrn Dr. Thomas Hackl danke ich sehr für die Messung und die Interpretationshilfe unzähliger Spektren.

Für die Unterstützung bei den praktischen Arbeiten danke ich den Forschungspraktikanten Sven Bettermann, Oliver Kardell und Jonas von Bergen.

Dr. Ivo Sarac danke ich für die stets hilfreichen fachlichen Diskussionen, die Unterstützung bei der Synthese der Oligonucleotide sowie die Unterstützung bei massenspektrometrischen Messungen der Analyten. Bei Frau Dr. Anna Rath möchte ich mich für die Einweisung in die Welt der Polymerase-Assays bedanken.

Für die fachlich, kritische Durchsicht dieser Arbeit sowie die Korrektur etwaiger Rechtschreib- und Grammatikfehler danke ich Herrn Dr. Florian Pertenbreiter und Herrn Dr. Tristan Gollnest.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Familie Ackermeier danke ich von Herzen für die großartige Arbeitsatmosphäre, die hervorragende Zusammenarbeit und die unvergessliche Zeit, insbesondere dem Labor OC 525 und dem 1-Mann-Labor OC 524. Den Herren Dr. Tristan Gollnest und Tobias Nack möchte ich an dieser Stelle auch für die fruchtbaren Diskussionen, die fachliche Unterstützung und die schöne, gemeinsame Zeit in den USA danken. Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Inga Reimer und Frau Dr. Katharina Pahnke, in denen ich nicht nur großartige Diskussionspartnerinnen, sondern auch bereits zu Beginn des Studiums vor mehr als 10 Jahren Freundinnen fand.

Dieser Dank gilt auch all meinen Freunden, die hier noch nicht genannt wurden. Ihr habt mich während des Studiums und auch während der Promotion in allen Lebensbelangen gestützt und ertragen – Roberto, Lena, Mario, Boris, Dennis, Flo Ohne Euch wäre diese Zeit nicht halb so wertvoll gewesen.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder Ricardo und meiner Freundin Lena, ohne die ich nicht derjenige wäre, der ich bin.

12. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsvorhaben eingereicht wurde.

Datum

Thiago Dinis de Oliveira